



**UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUÍZ GALLO”**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
BIOLOGÍA**

**“SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* Y
Streptococcus β -HEMOLÍTICO A DIFERENTES
CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS
HOJAS DE *Schinus molle* L. (MOLLE)”.**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN:
BIOLOGÍA – BIOLOGÍA GENERAL**

**PRESENTADO POR:
BR. VITÓN ANDIA, LISSET STEFANIA**

**LAMBAYEQUE – PERÚ
2018**

**UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUÍZ GALLO”**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
BIOLOGÍA**

**“SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* Y
Streptococcus β -HEMOLÍTICO A DIFERENTES
CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS
HOJAS DE *Schinus molle* L. (MOLLE)”.**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN:
BIOLOGÍA – BIOLOGÍA GENERAL**

**PRESENTADO POR:
BR. VITÓN ANDIA, LISSET STEFANIA**

**LAMBAYEQUE – PERÚ
2018**



**UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUÍZ GALLO”**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
BIOLOGÍA**

**“SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* Y
Streptococcus β -HEMOLÍTICO A DIFERENTES CONCENTRACIONES
DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Schinus molle* L.
(MOLLE)”.**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA – BIOLOGÍA GENERAL**

APROBADO POR:

Dra. Gianina Llontop Barandiarán

JURADO, Presidente

MSc. Consuelo Rojas Idrogo

JURADO, Secretaria

Lic. Julio Cesar Silva Estela

JURADO, Vocal

Lic. Mario Moreno Mantilla

PATROCINADOR

**LAMBAYEQUE – PERÚ
2018**

Dedicatoria

*A Dios por guiarme y siempre protegerme en esta parte
tan maravillosa de mi camino.*

*A mi familia en especial a mis padres Manuel y Karina, porque gracias
a su cariño, guía y apoyo he llegado a realizar uno de mis anhelos más grandes
de mi vida, fruto del inmenso apoyo, amor y confianza que en mi se depositó
y con los cuales he logrado terminar mis estudios profesionales
que constituyen el legado más grande que pudiera recibir
y por lo cual les viviré eternamente agradecida.*

*A mis hermanos Leslye, Christian y Piero, gracias por estar
conmigo, compartir los momentos tristes y sobre todo alegres de nuestras
vidas, me siento afortunada de ser su hermana,
los amo mucho.*

Agradecimientos

A mi asesor Lic. Mario Moreno Mantilla, por la orientación, por su apoyo y amistad que me permitieron aprender mucho más que lo estudiado en el proyecto, por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también haberme tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis.

A todos los docentes por sus enseñanzas que me otorgaron para así poder ser una buena profesional y sobre todo tener calidad humana y en especial a la Dra. Gianina Llontop Barandiarán, MSc. Consuelo Rojas Idrogo y Lic. Julio Cesar Silva Estela por sus oportunas correcciones en la revisión y evaluación los que han enriquecido la presente investigación.

*Cualquier cosa que la mente del hombre
puede concebir y creer, puede ser conseguida.*

Napoleón Hill

Lisset Stefania Vitón Andía

INDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1.	MATERIALES.....	16
3.1.1.	Material biológico.....	16
3.1.2.	Población y muestra	16
3.2.	MÉTODOS.....	19
3.2.1.	Aislamiento e identificación de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus</i> β -hemolítico.	19
3.2.2.	Obtención del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. (Herrera, 2013).....	22
3.2.3.	Concentraciones del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L. (molle).....	25
3.2.4.	Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. (molle).	25
3.2.5.	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. sobre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus</i> β -hemolítico. Método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del INS.	29
3.3.	DISEÑO DE CONTRASTACIÓN:.....	31
3.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS:	31
IV.	RESULTADOS.....	33

4.1. SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS <i>Staphylococcus aureus</i> Y <i>Streptococcus</i> β-HEMOLÍTICO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Schinus molle</i> L.	33
4.1.1. Promedio de los diámetros de halos de las cepas <i>Staphylococcus aureus</i>	33
4.1.2. Promedio de los diámetros de halos de las cepas <i>Streptococcus</i> β – hemolítico.	34
4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	37
4.2.1. Análisis estadístico de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
4.2.2. Análisis estadístico de <i>Streptococcus</i> β – hemolítico.	38
4.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Schinus molle</i> L. (MOLLE) SOBRE CEPAS DE <i>Staphylococcus aureus</i> Y <i>Streptococcus</i> β – hemolítico.	41
V. DISCUSIÓN	46
VI. CONCLUSIONES	50
VII. RECOMENDACIONES	51
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
IX. ANEXOS.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Concentraciones del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L.....	25
TABLA 2: Resumen del procesamiento para realizar la macrodilución en caldo.....	30
TABLA 3: Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L.	34
TABLA 4: Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de <i>Streptococcus</i> β -hemolítico a diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L.	35
TABLA 5: Análisis de varianza de la susceptibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L.	37
TABLA 6: Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L.	38
TABLA 7: Análisis de varianza de la susceptibilidad de <i>Streptococcus</i> β - hemolítico a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L.	39
TABLA 8: Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de <i>Streptococcus</i> β - hemolítico a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L.	40
TABLA 9: Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de <i>Streptococcus</i> β - hemolítico a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L.	41
TABLA 10: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus</i> β - hemolítico.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Hojas secas de <i>Schinus molle</i> L.	17
FIGURA 2: Concentraciones del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L.	17
FIGURA 3: Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	18
FIGURA 4: Cepas de <i>Streptococcus</i> β - hemolítico.	18
FIGURA 5: Aislamiento e Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> . A. Identificación de cepas en Agar Sangre. B. Identificación de la beta hemolisis. C. Prueba de la Fermentación del Manitol. D. Prueba de la Coagulasa.	20
FIGURA 6: Aislamiento e Identificación de <i>Streptococcus</i> β -Hemolítico. A. Identificación de la beta – hemolisis. B. Identificación de las características culturales. C. Prueba de la catalasa. (-) D. Crecimiento en el medio Caldo Tripticasa Soja	21
FIGURA 7: Diagrama de obtención del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L.	23
FIGURA 8: Elaboración del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L. A. Hojas secadas en horno. B. Trituración de hojas secas en mortero. C, D, E. Maceración de las hojas pulverizadas. F, G. Filtrado del macerado de hojas. H. Extracto de <i>Schinus molle</i> L. en la estufa para la evaporación del alcohol. I. Extracto seco de <i>Schinus molle</i> L.	24
FIGURA 9: Siembra en la superficie de la placa de Agar Müller Hinton con el inóculo de cada cepa incubado durante 24 horas.	28
FIGURA 10: Placas de petri con Agar Müller Hinton para la prueba de susceptibilidad bacteriana.	28
FIGURA 11: Diseño experimental para determinar la susceptibilidad de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus</i> β -hemolítico a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L.	32
FIGURA 12: Susceptibilidad de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L.	36

FIGURA 13: Susceptibilidad de cepas de <i>Streptococcus</i> β -Hemolítico (<i>S. pyogenes</i>) a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. .	36
FIGURA 14: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> . Cepa 1.	43
FIGURA 15: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> . Cepa 2.	43
FIGURA 16: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> . Cepa 3.	44
FIGURA 17: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. sobre cepas de <i>Streptococcus</i> β -Hemolítico. Cepa 1.	44
FIGURA 18: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. Sobre cepas de <i>Streptococcus</i> β -Hemolítico. Cepa 2.	45
FIGURA 19: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de Las hojas de <i>Schinus molle</i> L. sobre cepas de <i>Streptococcus</i> β -Hemolítico. Cepa 3.....	45

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Clasificación taxonómica de <i>Schinus molle</i> L.	61
ANEXO 2: Pared celular de <i>Staphylococcus aureus</i>	62
ANEXO 3: Pared celular de <i>Streptococcus</i> β -Hemolítico (<i>S. pyogenes</i>).	62
ANEXO 4: Estructura molecular de los componentes volátiles más comunes del aceite esencial de molle.....	63
ANEXO 5: Clasificación química de los taninos.	63
ANEXO 6: Imagen microscópica de <i>Staphylococcus aureus</i>	64
ANEXO 7: Imagen microscópica de <i>Streptococcus</i> β -Hemolítico.....	64
ANEXO 8: Prueba de susceptibilidad método de difusión en disco KIRBY BAUER.	65
ANEXO 9: Gráfico de la prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> en función a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L.	66
ANEXO 10: Gráfico de la prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los diámetros de inhibición de <i>Streptococcus</i> β -Hemolítico frente al extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L.	66
ANEXO 11: Gráfico de la prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de <i>Streptococcus</i> β -Hemolítico en función a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L.	67

RESUMEN

“Susceptibilidad de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. (molle)”.

Vitón Andia Lisset Stefania

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la susceptibilidad de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* frente al extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. (molle). Se trabajó con 3 cepas de *Staphylococcus aureus* (SA1, SA2, SA3) y 3 cepas de *Streptococcus* β -hemolítico (*S. pyogenes*) (BH1, BH2, BH3) y 5 concentraciones distintas del extracto etanólico de las hojas de molle (125 mg/mL, 250 mg/mL, 500 mg/mL, 750 mg/mL, 1000 mg/mL). La prueba de susceptibilidad de las cepas estudiadas frente al extracto etanólico de *Schinus molle* L. se realizó mediante el método de Disco difusión (Kirby – Bauer), y para la CMI se trabajó con el método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del INS. El diseño de investigación utilizado fue el de estímulo creciente, descrito por GOODE y HATT (1976). Y para los análisis estadísticos de los datos obtenidos en la experimentación correspondiente se realizó el ANAVA, con arreglo factorial (5 \times 6 \times 3); con un nivel de confianza del 95%, el cual se complementó con la Prueba discriminatoria de Tukey a 0.05 nivel de significación (STELL y TORRIE, 1983). Como resultado se obtuvo que todas las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico (*S. pyogenes*) en estudio fueron susceptibles al extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L., con halos de inhibición que oscilan entre 5.3 - 14.6 mm; 7.3 – 17.0 mm respectivamente. La Concentración Mínima Inhibitoria para SA1, SA2 y SA3 fue 62.5 mg/mL, para BH1 es 15.62 mg/mL, a diferencia de las BH2 y BH3 con una concentración mínima de 7.81 mg/mL.

Palabras claves: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* β -hemolítico, *Schinus molle* L., Método de Disco difusión, Concentración Mínima Inhibitoria.

ABSTRACT

"Susceptibility of strains of *Staphylococcus aureus* and β -hemolytic *Streptococcus* at different concentrations of the ethanolic extract of the leaves of *Schinus molle* L. (molle)".

Vitón Andia Lisset Stefania

The objective of this research work was to determine the susceptibility of strains of *Staphylococcus aureus* and β -hemolytic *Streptococcus* (*S. pyogenes*) to the ethanolic extract of the leaves of *Schinus molle* L. (molle). We worked with 3 strains of *Staphylococcus aureus* (SA1, SA2, SA3) and 3 strains of β -hemolytic *Streptococcus* (*S. pyogenes*) (BH1, BH2, BH3) and 5 different concentrations of the ethanolic extract of the leaves of molle (125 mg / mL, 250 mg / mL, 500 mg / mL, 750 mg / mL, 1000 mg / mL). The susceptibility test of the strains studied against the ethanolic extract of *Schinus molle* L. was carried out by means of the Disc diffusion method (Kirby - Bauer), and for the CMI, the macrodilution method was carried out in a tube according to Peruvian Technical Standard N °. 30 of the INS. The research design used was that of increasing stimulus, described by GOODE and HATT (1976). And for the statistical analyzes of the data obtained in the corresponding experimentation, the ANAVA was performed, with a factorial arrangement (5×6×3); with a confidence level of 95%, which was complemented with Tukey's discriminatory test at 0.05 level of significance (STELL and TORRIE, 1983). As a result, it was obtained that all strains of *Staphylococcus aureus* and β -hemolytic *Streptococcus* (*S. pyogenes*) in study were susceptible to the ethanolic extract of the leaves of *Schinus molle* L., with halos of inhibition ranging between 5.3 - 14.6 mm; 7.3 - 17.0 mm respectively. The Minimum Inhibitory Concentration for SA1, SA2 and SA3 was 62.5 mg / mL, for BH1 it is 15.62 mg / mL, unlike BH2 and BH3 with a minimum concentration of 7.81 mg / mL.

Key words: *Staphylococcus aureus*, β -hemolytic *Streptococcus*, *Schinus molle* L., Dissemination Disc Method, Minimal Inhibitory Concentration.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas ocasionadas por diversas cepas patógenas, es uno de los problemas de salud a nivel mundial y que está creando la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamiento debido a la resistencia que presentan los microorganismos, debido al uso indiscriminado de antimicrobianos, por lo que han adaptado sus defensas, a través de mutaciones y a la adquisición de plásmidos de resistencia a drogas de primera línea (INS, 2007) convirtiéndose en un problema de carácter mundial para los profesionales encargados de las ciencias de la salud.

Staphylococcus aureus desde su descubrimiento por el médico Alexander Ogston en 1880, es considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano y en los animales. *Staphylococcus aureus* es la especie tipo del grupo, considerada la más virulenta, responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel (impétigo, carbunco, forúnculo, Síndrome de shock tóxico, Síndrome de la piel escaldada) y tejidos blandos (celulitis, fascitis necrosante) hasta infecciones graves que amenazan con la vida del paciente. El impacto de las cepas de *S. aureus* sobre la salud es la resistencia que puede presentar a múltiples antibióticos, sobre todo a la meticilina.

Por otro lado *Streptococcus* β -hemolítico del grupo A, es ubicuo en la naturaleza, es la causa más frecuente de faringo-amigdalitis aguda bacteriana y su importancia médica se debe a sus secuelas no supurativas como la Glomerulonefritis y fiebre reumática. En las últimas dos décadas ha habido un incremento en el número de casos de fiebre reumática y de formas invasoras por *Streptococcus* a nivel mundial, lo que sugiere un cambio en la epidemiología de la bacteria, especialmente en lo que concierne a virulencia. (Rivera, 1998).

En este contexto, es necesario la búsqueda de nuevos principios activos con actividad antibacteriana. Así, la fitoterapia se convierte en una práctica terapéutica alternativa que se basa en el uso de plantas medicinales y de sus extractos y entra en el gran grupo de las medicinas alternativas o complementarias (Pignatelli, 2009). Es así que su progreso en los últimos años se ha debido al conocimiento de los principios activos y a las múltiples

ventajas que aportan a la población. En la actualidad cerca de un 80% de la población mundial hace uso de la fitoterapia como medida de atención primaria en el manejo de enfermedades (Organización Mundial de la Salud).

Schinus molle L. se presenta como una alternativa para el tratamiento contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico, debido a la importancia de sus principios activos, así tenemos que a las hojas se le atribuye propiedad antibacteriana por la gran cantidad de taninos, alcaloides, flavonoides entre otros principios activos que posee; así como también propiedad, antiséptica, astringente, balsámico y emenagoga. Varios tipos de extractos acuosos, etanólicos hexanoicos, hidroalcohólicos e incluso el aceite esencial de las hojas de *Schinus molle* L. muestran acción frente a diversas cepas patógenas.

Como propiedades medicinales generales se puede mencionar que las hojas se usan como cataplasmas calientes y las flores contra el reumatismo y otros dolores musculares. Las hojas de molle en infusión, junto con hojas de eucalipto, se emplean en inhalaciones para el alivio de afecciones bronquiales, tos, gripe, asma y tuberculosis.

Con el presente estudio se desea comprobar y validar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Staphylococcus aureus miembro de la familia *Staphylococcaceae* es un coco gram positivo cuyas células miden aproximadamente 1 μm de diámetro, se agrupan en racimos que son indicativos de que tienen la capacidad de dividirse en más de un plano. Su respiración es aeróbica y anaeróbica y la mayoría de las cepas pueden fermentar el manitol de manera anaeróbica. Sobre el agar sangre forman colonias doradas (latín *aureum*) o blancas. Producen catalasa, coagulasa y un factor de agrupamiento extracelular, algunas cepas producen cápsulas. (García, 2006).

Es considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano y en los animales. Provoca con más frecuencia infecciones de piel y partes blandas como: impétigo, foliculitis, forúnculos, celulitis, mastitis, erisipela, abscesos cutáneos y orzuelo, que se limitan de una pequeña área de la piel de la persona. También es causante de infecciones de material protésico, infección de heridas quirúrgicas, endocarditis, meningitis; así mismo pueden liberar sustancias tóxicas que producen enfermedades tales como intoxicación por alimentos. *S. aureus* produce, secreta enzimas y toxinas que son consideradas como potenciales factores de patogenicidad. Dentro de estas enzimas que produce *S. aureus* se encuentra: catalasa, coagulasa, lipasas, hialuronidasa y nucleasa. También elabora productos extracelulares llamadas toxinas donde se han definido 3 grupos principales y son; toxinas citolíticas, enterotoxinas y toxina exfoliativa o epidermolítica. Produce además una serie de toxinas implicadas en el Síndrome de Shock Tóxico. (Park y Chess, 2012; Romero, 2007).

La mayor parte de estas infecciones ocurren en personas en las que no se reconocen factores de riesgo, principalmente niños y adolescentes. Generalmente ocurre en poblaciones cerradas o semicerradas (militares, reclutas, prisioneros, atletas y guarderías), hombres que tienen sexo con hombres y grupos con bajo estatus económico. Estas cepas han sido encontradas en todo el mundo incluyendo Norteamérica y Europa con áreas que reportan una incidencia de alrededor del 20 %. (Broseta *et al.*, 2006; Aramburu *et al.*, 2006). El impacto de las cepas de *Staphylococcus aureus* sobre la salud es la resistencia que puede presentar a múltiples antibióticos, sobre todo a la meticilina. (Kaplan *et al.*, 2005; Purcell y Fergie, 2005).

A finales de la década de 1950, aproximadamente el 85% de todas las cepas de la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* eran resistentes a la penicilina en USA y Francia. La síntesis y comercialización de las nuevas penicilinas, Meticilina y Oxacilina, resistentes a la penicilinas, fue el aldabonazo que, así se creía, terminaría con el problema de las resistencias de las cepas de *Staphylococcus aureus*. (Kaplan *et al.*, 2005; Purcell y Fergie, 2005).

Sin embargo a través de los años se ha incrementado la tasa de morbilidad y mortalidad a pesar del gran número de antibióticos disponibles que existen. *Staphylococcus aureus* forma parte de la flora normal del humano, entre 25 y 50% de la población sana está colonizada por esta bacteria, constituyendo un riesgo por su diseminación. Éste puede ser adquirido a través del contacto con otras personas o por exposición al ambiente. En los últimos años han aumentado de forma notable las infecciones por este microorganismo, en especial por cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilina (SAMR). (Kaplan *et al.*, 2005; Purcell y Fergie, 2005).

Las infecciones por SAMR fueron, en su inicio, de origen nosocomial (HA-SAMR), y ocurrían frecuentemente en personas hospitalizadas, enfermas o en trabajadores de la salud, por eso se les denominó SAMR adquirido en el hospital (HA-SAMR); sin embargo, a finales de los años 90, ha existido una emergencia de SAMR porque provoca infecciones en la comunidad, con una susceptibilidad antimicrobiana diferente que las cepas hospitalarias. Estas cepas representan un problema potencialmente muy serio, y los primeros reportes que llamaron la atención sobre ellas fueron las muertes por neumonía necrotizante de 4 niños sanos en Estados Unidos entre 1997 y 1999. El primer reporte de una infección por HA-SAMR en Sudamérica fue hecho en Brasil en el año 2005. (Ribeiro *et al.*, 2005).

El Centro de Enfermedades Infecciosas estima que en EUA en el año 2005 se desarrollaron 94,360 infecciones invasivas por *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilina. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un incremento progresivo de infecciones producidas por cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilina, con una sensibilidad a los antibióticos diferente que afecta a la población sana sin haber tenido contacto previo con los hospitales o clínicas de salud. Estas infecciones

provocadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina adquiridas en la comunidad pueden desarrollar diferentes enfermedades, siendo las más comunes en la piel y tejidos blandos. (Kaplan *et al.*, 2005; Purcell y Fergie, 2005).

La infección por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR) es una de los principales patologías que se presenta a nivel mundial, presentando infecciones osteoarticulares, en piel, sistema gastrointestinal y respiratorio principalmente. Tradicionalmente el *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR) ha sido considerado un patógeno nosocomial, los aislamientos de SAMR nosocomiales se caracterizan por presentar resistencia a múltiples grupos de antibióticos además de los betalactámicos. En la última década se han publicado numerosos reportes de colonización e infección por SAMR en individuos provenientes de la comunidad, incluso en personas sin contacto hospitalario previo. De acuerdo con los resultados publicados. La incidencia anual es de 28,4 casos por cada 100.000 ingresos hospitalarios lo que supone una tasa de Mortalidad anual de 4,9 casos por cada 100.000 personas. (Kaplan *et al.*, 2005; Purcell y Fergie, 2005).

La tasa de mortalidad de la infección invasiva por *Staphylococcus aureus* es alta, variando entre el 19 y el 34%; en el último estudio EPINE, correspondiente al año 2007, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR) con una prevalencia del 10,6% ocupa el segundo lugar en orden de frecuencia entre los microorganismos causales de infección nosocomial en los hospitales españoles, por detrás de *Escherichia coli* (15,4%) y por delante de *Pseudomonas aeruginosa* (10,3%).(Kaplan *et al.*, 2005; Purcell y Fergie, 2005).

Una serie de estudios transversales, 1996, 2002 y 2006 puso de manifiesto el progresivo incremento de la prevalencia de aislados de SAMR que, en las sucesivas revisiones pasó de un 10,5%, a un 11,2 Y 31,2 % respectivamente, así mismo, un estudio de 8.312 cepas procedentes de infecciones observadas entre 1993 y 2003 en 296 hospitales mostró un incremento de la resistencia desde el 22 % en 1993 al 41% en 2006. La incidencia de bacteriemia nosocomial por SAMR fue de 1,45 episodios por 1.000 pacientes que ingresaron a unidades de cuidados intensivos. (Kaplan *et al.*, 2005; Purcell y Fergie, 2005).

La mayoría de los estudios de seguimiento y descripción en nuestro medio correspondientes a infecciones por SAMR se centran en infecciones del área de cuidados intensivos y complicaciones respiratorias por *Staphylococcus aureus*, así como su impacto en la salud pública de dichas infecciones. Sin embargo *Staphylococcus aureus* puede recurrir con frecuencia en localizaciones osteoarticulares asociadas o no a material de osteosíntesis. (Kaplan *et al.*, 2005; Purcell y Fergie, 2005).

En nuestro País, ya en 1996 en un estudio multicéntrico en Lima, se encontró 63 % de SAMR. Estudios posteriores muestran niveles que varían de 50 a 90%. (Echevarria e Iglesias, 2003; Mamani *et al.*, 2006).

En un estudio realizado *S. aureus* resistente a meticilina representa el 18,4% (1321) del total de aislamientos reportados por los hospitales (7163). La resistencia a la meticilina es reportada en 75,6% de los aislamientos, no habiendo diferencias significativas entre los hospitales del Ministerio de Salud y los hospitales de EsSalud. (Arce y Asalde, 2012)

En Lambayeque no se han realizado trabajos de investigación sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SAMR). Los trabajos con los que se cuentan actualmente, han sido realizados en otras localidades tanto a nivel nacional e internacional, con ambientes y realidades muy diferentes a nuestra localidad por lo que se hace necesario realizar una búsqueda de nueva y mejor información respecto al mecanismo de diseminación local de SARM, que pueda proveer herramientas para su control.

Los *Staphylococcus* desarrollaron una rápida resistencia a los antibióticos después de la introducción de la penicilina y en la actualidad una proporción inferior al 10% de las cepas es sensible a este antibiótico. Esta resistencia está mediada por la enzima penicilinasa (β -lactamasa específica para las penicilinas), la cual hidroliza el anillo β -lactámico de la penicilina. La información genética que codifica la producción de esta enzima se encuentra en un plásmido transmisible, lo que facilita la rápida diseminación de resistencias entre los *Staphylococcus*. Las penicilinas y otros antibióticos β -lactámicos destruyen las bacterias por su capacidad de unirse a las proteínas de unión a la penicilina, las cuales constituyen las enzimas responsables de la construcción de la pared de

peptidoglucano. Hasta hace poco tiempo, las cepas SAMR se restringían únicamente a los entornos hospitalarios; no obstante, a lo largo de los últimos años se han descrito algunos brotes comunitarios por SAMR, a pesar de la diversidad geográfica de los brotes, las cepas parecen presentar una relación clonal y difieren de las cepas de SAMR aisladas en los hospitales. (Park y Chess, 2012; Romero, 2007).

Otra bacteria importante causante de infecciones del tracto respiratorio es *Streptococcus* β – Hemolítico del grupo A (*Streptococcus pyogenes*) constituye un problema de salud mundial, sobre todo en países en vías de desarrollo. La mayoría de estas infecciones pueden ser causadas por virus y no tener importancia significativa por ser benignas y autolimitadas; sin embargo las infecciones respiratorias bacterianas constituyen una importante causa de muerte cuando no se recibe el tratamiento oportuno. (Prats, 2005).

El agente etiológico más frecuente en infecciones respiratorias bacterianas es *Streptococcus* β – Hemolítico del grupo A (*Streptococcus pyogenes*) causante de faringitis; una de las enfermedades más frecuentes en niños, de quienes se aísla del 15 al 30% de los casos. En los adultos se aísla del 5 – 10% de los casos y es raro en los mayores de 50 años. Se presenta con mayor frecuencia en épocas de invierno y primavera; convirtiéndose en una de las causas más importantes de las visitas médicas en los centros. (Piñero *et al.*, 2011; Madigan *et al.*, 2003).

La faringitis estreptocócica se transmite generalmente de persona a persona por gotitas de saliva emitidas al toser, estornudar o simplemente hablar; el cuadro clínico incluye dolor de garganta con inflamación de la faringe y exudado blanquecino en las amígdalas, fiebre, escalofríos, cefalea y malestar general; es una enfermedad leve pero que puede tener complicaciones supurativas, no supurativas o mediadas por toxinas, dentro de las más graves se reconocen las complicaciones no supurativas como fiebre reumática aguda, crónica y Glomerulonefritis aguda; dentro de las mediadas por toxinas desencadena Síndrome de Shock Tóxico. (Braun 2003; Madigan *et al.*, 2003).

Los miembros del género *Streptococcus* son cocos esféricos, Gram positivos, no esporulados, homofermentativos, anaerobios facultativos, oxidasa negativos, que por lo

general se disponen en cadenas largas cuando crecen en medio de cultivo; tienen un crecimiento óptimo en medios enriquecidos como agar sangre, sus colonias son pequeñas, grisáceas de 1 a 2 mm con zonas grandes de β – Hemólisis (hemólisis total de glóbulos rojos). Se aísla frecuente de personas adultas sanas. Se estima que entre 5 – 15% de los individuos sanos albergan la bacteria, generalmente en el tracto respiratorio, sin signos de enfermedad. Como parte de la flora normal, *Streptococcus* puede producir enfermedad cuando las defensas están en peligro o cuando los organismos son capaces de penetrar las defensas constitutivas del individuo. (Koneman *et al.*, 2004).

El diagnóstico microbiológico de faringitis estreptocócica se realiza mediante el cultivo de secreción faríngea con la ayuda de una torunda estéril, en agar sangre, realizando en forma correcta tiene una sensibilidad de 90 – 95%. La muestra se obtiene rotándolo en ambas amígdalas. El cultivo se incuba a 35 – 37 °C por 18 – 24 horas. Cuando una muestra resulta positiva el tratamiento de elección es con Penicilina V oral durante 10 días, en los pacientes con antecedentes de alergia a la penicilina, se puede usar eritromicina o una cefalosporina oral. (Díeza *et al.*, 2007).

Streptococcus β – Hemolítico del grupo A no ha desarrollado resistencia a las penicilinas y/o cefalosporinas o mostrado un aumento en la concentración mínima inhibitoria (CIM) a pesar de sus amplio uso por más de 50 años. La estabilidad en la susceptibilidad a la penicilina se observa en un estudio realizado con cepas recogidas de todo el mundo durante 80 años, en el cual se evidencia que no se ha presentado ningún cambio en la susceptibilidad a penicilina en *Streptococcus* siendo la CIM de 0.031 $\mu\text{g/mL}$ para todos ellos. Sin embargo en los últimos años en muchos países se ha aumentado el uso de eritromicina generando resistencia a estos macrólidos; describiéndose en diversos países cifras de resistencia a eritromicina que van desde el 0.5% hasta el 60%. (Herrera, 2013).

Cabanillas *et al.*, (2012) investigaron y dieron a conocer las principales características de la sepsis neonatal en el servicio de neonatología del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo – Chiclayo, dando a conocer que ambas bacterias (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*) son los responsables de dicha infección, dando como resultado 95 casos de sepsis confirmada, de los cuales el 38,9 % fueron de sexo femenino,

12,6% fallecieron. La incidencia de sepsis neonatal fue de 34 casos por mil nacidos vivos durante el año 2011 y 24 casos en el 2012.

Y es así como surge la resistencia bacteriana un mal que acarrea la actualidad; esto se debe a una gran variedad de antibióticos de primera, segunda y hasta tercera generación que ofrecen una amplia variedad de opciones para el tratamiento de padecimientos causados por bacterias. Estos antibióticos están perdiendo eficacia por el aumento progresivo de la resistencia microbiana, lo que constituye un problema de primera línea para la salud pública global. Esto se debe, principalmente al tratamiento farmacológico incompleto de los pacientes, debido a la automedicación, y abandono de los tratamientos respectivos. (Gómez y Pereira, 2016).

A esto se suma, el uso irracional de antibióticos que contribuyen a la aparición de cepas microbianas Multi-Droga-Resistentes (MDR). (Durafourd *et al.*, 1986). Este problema, se agudiza cada vez por el elevado costo de los fármacos, lo cual resulta inaccesible para la población de bajo recursos económicos. (Organización Panamericana de Salud, 1998).

El aumento constante de la resistencia bacteriana, así como sus efectos indeseables, ha llevado a los científicos a investigar nuevas sustancias antimicrobianas a partir de plantas consideradas popularmente medicinales. La Organización Mundial de la Salud estima que casi el 80% de todos los habitantes de la tierra, confían en medicinas tradicionales para resolver sus principales necesidades de salud. Es así que muchos investigadores han realizado diversos estudios utilizando los principios activos obtenidos a partir de extractos de hojas, raíces, bulbos y frutos con el fin de comprobar su efectividad como sustancias antimicrobianas y así puedan ser utilizadas como tratamiento alternativo a las infecciones bacterianas, sin que esto implique un daño para el paciente. (Villar y Villavicencio, 1992; Heleno, 2004).

El Perú, posee una gran biodiversidad en cuanto a flora, siendo alrededor de 300 mil especies vegetales consideradas de uso medicinal y muchas de ellas han sido empleadas por nuestros ancestros en el tratamiento de enfermedades producidas por microorganismos pero, en cuanto a estudios farmacológicos y principios activos de las

plantas medicinales en la Amazonía peruana aún son escasos, por lo que existe poca información científica que determine la sensibilidad o resistencia a muchos microorganismos. (Gómez y Pereira, 2016).

Así la fitoterapia se convierte en un tratamiento terapéutico alternativo en donde se utilizan las plantas medicinales las cuales contienen, en alguno de sus órganos, principios activos. En la actualidad se calcula unas 260,000 especies de plantas, de las que el 10 % se puede considerar medicinal. Según la clasificación de tratados médicos de fitoterapia, en épocas modernas y pasadas, las regiones tropicales son favorecidas por la proporción de especies medicinales, teniendo en cuenta que todavía no se conoce la totalidad de la flora vegetal. (Gómez y Pereira, 2016).

Las plantas son laboratorios naturales donde se biosintetiza una gran cantidad de sustancias químicas, de hecho se les considera como la fuente de compuestos químicos más importante que existe. Un gran porcentaje de los principios activos está comprendido dentro de los llamados productos naturales o metabolitos secundarios, que son compuestos químicos de estructuras relativamente complejas y de distribución restringida. Entre estos metabolitos son comunes aquellos con funciones defensivas contra insectos, bacterias, hongos, como son los alcaloides, aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles, flavonoides, cumarinas, quinonas, taninos y terpenoides. Se ha demostrado que existe gran variación en cuanto a la concentración de estos en la planta, no hay un patrón de máxima producción ni órganos especiales de almacenaje de metabolitos secundarios, sin embargo, lo común es que las mayores concentraciones de estos tipos de compuestos se encuentren en hojas, flores y semillas. (Gómez y Pereira, 2016).

Una de las especies más reconocidas en nuestro país por sus propiedades curativas es *Schinus molle* L. perteneciente a la familia *Anacardiácea*, como molle, árbol del Perú, pirul o falsa pimienta. Es oriundo de los valles interandinos del centro del Perú, especialmente en las regiones áridas y semiáridas de la serranía. Crece también en zonas secas de la Costa y parte de la Amazonía, desde el nivel del mar hasta los 3500 m.s.n.m. Puede medir entre 10 y 12 metros de alto, tiene un diámetro de 1.5 metros en la base y es muy ramificado en la parte superior. Su follaje es perenne, denso y tiene ramas

colgantes, las hojas son muy aromáticas y miden de 1.5 a 4 cm de largo, sus flores son pequeñas, hermafroditas o unisexuales; los frutos tienen un color rojizo muy llamativo y están agrupados en racimos. (Salazar, 2001).

Schinus molle L. es usado en medicina tradicional como antirreumático, laxante, cefalálgico, cicatrizante, depurativo de la sangre y antiespasmódico. También es usado para combatir malestares de riñón, vejiga e hígado, así como dolores corporales y algunas afecciones respiratorias. *S. molle* contiene taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas esteroidales, esteroides, terpenos, gomas, resinas y aceites esenciales; los aceites esenciales están presentes en hojas, corteza y frutos, constituyendo una fuente de triterpenos, sesquiterpenos y monoterpenos; las hojas contienen hasta un 2% de aceites esenciales, el fruto puede contener hasta un 5% de aceites esenciales además de la presencia de: α -pineno, β -pineno, piperina, (+)-limoneno, piperitona, carvacrol, mirceno, β -espatuleno y β -felandreno, entre otros compuestos. (Segura *et al.*, 2015).

Para conocer los compuestos o sustancias químicas de una planta es necesario un método de extracción en el cual se requiera de alguna sustancia apropiada. Voight (1982), demostró que el alcohol no produce gelificación de las membranas celulares de las plantas y que por el contrario favorece la estabilidad de las sustancias medicamentosas disueltas; también mencionó que el agua posee notable fuerza de extracción de numerosas sustancias de interés terapéutico. La mezcla de disolventes polares y apolares ofrece además, ventajas para extraer diversos compuestos como flavonoides, taninos, fenoles y otros metabolitos secundarios de las plantas. (García, 2001 y Martínez, 2005).

De este modo, Herrera en el 2013 determinó el efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Schinus molle* L. “molle” sobre la viabilidad de *Streptococcus* β -hemolítico “in vitro”. En donde el diámetro de los halos varía de 10.73 hasta 22.57 (mm) que a medida que aumentan las concentraciones de extracto hidroalcohólico de hojas de *Schinus molle* L. en el rango de 250 a 1000 mg/mL aumenta el diámetro del halo de inhibición del crecimiento *Streptococcus* β -hemolítico.

En otros estudios realizados por Gualtieri *et al.*, (2012) en donde realizaron un estudio sobre la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas y el extracto hexanoico obtenido de los frutos del *Schinus molle* L., el cual mostró una buena actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas como *S. aureus* ATCC 29213 y *E. faecalis* ATCC 29212) dando como valor de CMI 16 µg/mL y CMB valores comprendidos entre 32 y 64 µg/mL, respectivamente.

Así mismo se trabajó otro extracto de *Schinus molle* L. utilizando como solvente de extracción el etanol al 96% contra *Staphylococcus aureus* en donde mostró un CMI de 9,6mg/0,2mL. Y una de CMB 22 mg/mL. (Cruz *et al.*, 2010).

En las levaduras *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida albicans* cepa clínica, se evaluó la actividad antifúngica del extracto etanólico de *Schinus molle* L. (corteza y hojas) mediante los métodos de difusión en agar y dilución en agar para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en donde se obtuvo una CMI de 250 µg/mL. (Huamaní y Ruiz, 2005).

Se investigó el efecto *in vitro* del extracto acuoso de *Schinus molle* L. “molle” sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Los resultados indicaron que a partir de la concentración de 10% hay un efecto inhibitorio *in vitro* y la concentración mínima inhibitoria (CIM) fue al 40%. (Alfaro, 2015).

En estudios realizados por Huaihua y Tacusi (2016) probaron si los extractos acuosos de *Schinus molle* L. en diferentes dosis tiene un efecto de tipo alelopático sobre los bancos de semillas de malezas de Izcuchaca (Anta) y el Invernadero de la UNSAAC. Los extractos acuosos de *S. molle* revelaron su acción fitotóxica al 20% para las dos variables evaluadas, pero bajo las concentraciones 2%, 5% y 10% no mostraron efecto para el banco de semillas de malezas de Izcuchaca. Sin embargo para el invernadero se observó un efecto alelopático significativo a las dosis empleadas, a excepción de la concentración 2%.

De otro lado, un aceite esencial está constituido por un número amplio de compuestos químicos, lo más probable es que su acción antibacteriana no sea atribuible

a un mecanismo específico, sino a una sinergia entre todos los componentes. Una característica importante que presentan los aceites esenciales es su hidrofobicidad, lo que les permite adherirse a la membrana de la célula bacteriana, afectando su presión y por consiguiente la hace más permeable ocasionando la fuga de iones presentes al interior de la célula. Básicamente el efecto antimicrobiano que ejerce un aceite esencial se debe a su efecto a nivel de la perturbación de la membrana citoplasmática, la alteración de la fuerza motriz de protones y el flujo de electrones. Los daños a la pared y membrana de la célula ocasionan la fuga de macromoléculas y por consiguiente la lisis. En general, el efecto antimicrobiano se debe principalmente a la presencia de fenoles, aldehídos y alcoholes (Yañez y Cuadro, 2012).

De este modo Garay et al., en el 2016 evaluaron el efecto antibacteriano *in vitro* de los aceites esenciales de *Schinus molle* L., frente a la cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 35668). Las lecturas de los halos de inhibición se realizaron a las 48 horas. Resultando así: el aceite esencial de *Schinus molle* L. a una concentración del 100% presentó un halo de inhibición de 16.3mm, al 75% 14.7 mm de diámetro de inhibición. En donde se concluyó que el aceite esencial de *Schinus molle* L. presenta efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 35668). (Garay et al., 2016).

Cedamano y Mejía (2014) se plantearon esta interrogante ¿cuál es el efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de *Shinus molle* L. “molle” sobre el *Streptococcus mutans*? Llegaron a la conclusión que la concentración mínima inhibitoria es 25%. De igual manera Rivadeneira y Álvarez (2015) evaluaron el potencial antimicrobiano *in vitro* del aceite esencial de *Schinus molle* L. como sustancia natural comparada con el gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) en donde usaron concentraciones del aceite del 100 y 50%, a su vez, se utilizó el hidrolato o residuo de vapor de condensación del aceite, gluconato de clorhexidina (control positivo), agua destilada (control negativo), y comparar el efecto antimicrobiano de las sustancias naturales con el gluconato de clorhexidina al 0,12% comportamiento que se evaluó a las 24 y 72 h de exposición. Teniendo como resultado que las concentraciones, además del residuo del aceite de *S. molle*, provocaron efecto antimicrobiano frente a la cepa de *S. mutans* (ATCC 25175), con valores de significancia ($p>0,05$) y de la comparación, el gluconato de clorhexidina al 0,12% produjo mayor inhibición, pero

disminuyó parcialmente su efecto a las 72 h, mientras que las concentraciones al 100 y 50% potencializaron su efecto en un 0,8% a las 72 h.

Para probar el efecto antimicótico del aceite esencial de *Schinus molle* Vázquez y Díaz (2011) sobre *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533) usaron 24 placas Petri en donde se sembró la cepa liofilizada en Agar Mycosel, cada placa se dividió en cuatro cuadrantes y se pusieron discos de sensibilidad embebidos de aceite de molle, en concentraciones de 2%, 4%, 6%, 8%, 10% y 12%, se utilizó aceite mineral de control. Observándose que existe inhibición de crecimiento en todas las concentraciones en promedios de 0,61 mm, 0,81 mm, 0,83 mm, 0,88 mm, 0,90 mm y 1,23 mm para las concentraciones de 2%, 4%, 6%, 8%, 10% y 12% respectivamente.

Con el afán de poder combatir problemas de parasitismo determinaron el poder acaricida del aceite esencial crudo de aguaribay (*Schinus molle* L.) y sus fracciones, en el control de la varroa (*Varroa destructor*), en donde evaluaron la eficacia de los productos ensayados, para lo cual se realizaron experiencias en colmenares de abejas (*Apis mellifera*), midiéndose la cantidad de ácaros totales y los eliminados por el producto. Los valores de eficacia fueron: 30 ± 6 para la fracción 2 que posee mayor concentración de pinenos y 38 ± 6 para la fracción 5 de mayor concentración en terpinen-4-ol, que el aceite esencial crudo cuya eficacia es 9.2. El uso de un producto natural, cuando no se pueden aplicar productos sintéticos, mantiene baja la cantidad de varroas. El incremento en el volteo del ácaro se puede atribuir al aumento de la concentración de pinenos y a la alta concentración del terpinen-4-ol en las fracciones ensayadas. (Guala *et al.*, 2014).

En otras investigaciones se demostraron la actividad de extractos vegetales sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* y otras cepas en las cuales se demostró la actividad de estos sobre las cepas mencionadas. Tal es el estudio realizado por Garay *et al.*, (2016) en donde *Piper elongatum*, y *Minthostachys setosa* presentaron efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 35668).

En un estudio en donde se determinó el efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” sobre la viabilidad de *Streptococcus* β -hemolítico “in vitro”. Se encontró que el promedio de los halos de inhibición de los cultivos a las

diferentes concentraciones ensayadas varía de 22,3 a 37,3mm. Resultando que a medida que aumenta la concentración del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” en el rango de 250 a 1000 mg/mL, se obtiene un mayor diámetro de halo de inhibición de *Streptococcus* β -hemolítico. (Gutiérrez, 2013).

Huamaní y Ruiz (2005) investigaron la actividad antifúngica in vitro de doce extractos etanólicos correspondientes a diez plantas medicinales peruanas; *Annona cherimolia* Mill. (Hojas), *Annona muricata* L. (corteza y hojas), *Bidens pilosa* L. (partes aéreas), *Hypericum laricifolium* L. (partes aéreas), *Juglans neotropica* Diels (corteza), *Piper* spp. (Hojas), *Plantago major* L. (hojas), *Psidium guajava* L. (hojas), *Schinus molle* L. (corteza y hojas) y *Spartium junceum* L. (planta entera). Los microorganismos de prueba que utilizaron fueron las levaduras *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida albicans* cepa clínica, así como, el hongo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 16404; se investigaron doce extractos, seis presentaron actividad antifúngica consistente con un diámetro de halos de inhibición #18mm (Prueba de Difusión en agar) frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ningún extracto mostró actividad consistente frente a la cepa clínica de *Candida albicans* y *Aspergillus niger* ATCC 16404. La CMI de los extractos que presentaron actividad consistente frente a *Candida albicans* ATCC 10231, fue de 250 μ g/mL para *Hypericum laricifolium* L., *Juglans neotropica* Diels, *Psidium guajava* L. y *Schinus molle* L. (un extracto de corteza y uno de hojas) y de 500 μ g/mL para *Piper* spp.

Haciendo uso de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” de manera in vitro en un extracto etanólico se demostró su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de cepas como *Streptococcus pyogenes* (RE1, RE2, RE3), *Staphylococcus aureus* (SY1, SY2, SY3) y *Pseudomonas aeruginosa* (PF1, PF2, PF3). (Rodríguez et al., 2014).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad “Nacional Pedro Ruíz Gallo” (Lambayeque).

3.1. MATERIALES

3.1.1. Material biológico

Hojas de *Schinus molle* L. “MOLLE”. Las plantas fueron colectadas en el departamento de Lambayeque; en el Campus de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional “Pedro Ruíz Gallo” en perfectas condiciones edáficas y fitosanitarias.

Cultivos puros de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico aislados e identificados en el Laboratorio de Microbiología Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo.

3.1.2. Población y muestra

La población estuvo constituida por cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico obtenidas a partir de muestras de heridas y de hisopado faríngeo de personas con faringitis.

La muestra estuvo representada por tres cepas de *Staphylococcus aureus* y tres cepas de *Streptococcus* β -hemolítico, obtenidas a partir de muestras clínicas (heridas y secreción faríngea), enfrentadas a 5 concentraciones de 125 mg/ml, 250 mg/ml, 500 mg/ml, 750 mg/ml y 1000 mg/ml, del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L.; considerándose tres repeticiones por cepa, se tuvo un total de 90 unidades experimentales.



Figura 1: Hojas secas de *Schinus molle* L.



Figura 2: Concentraciones del extracto etanólico de *Schinus molle* L.



Figura 3: Cepas de *Staphylococcus aureus*



Figura 4: Cepas de *Streptococcus* β - Hemolítico.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Aislamiento e identificación de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico.

- Las cepas de *Staphylococcus aureus*, se obtuvieron a partir de muestras de heridas, se sembraron en placas de Petri estériles con Agar Sangre en las que se comprobó las características culturales de las colonias rodeadas de hemólisis tipo β . Y se realizó las pruebas de fermentación del manitol (después de incubarse durante 18-24 horas, se observaron colonias de 0.5-1.5 mm de diámetro, lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, presentan consistencia cremosa y pigmentación que va del amarillo a dorado) en aerobiosis y anaerobiosis y la prueba de coagulasa.
- Las cepas de *Streptococcus* β -hemolítico, se obtuvieron mediante hisopado faríngeo, se sembraron en placas de Petri estériles con Agar Sangre al 5% y medio TSA, se incubó a 37 °C por 24 horas. Luego se identificaron las colonias con presencia de β eta Hemólisis, por su morfología macroscópica (colonias pequeñas, circulares, brillantes) y su crecimiento en el medio Caldo Tripticasa Soja y por su sensibilidad a la Bacitracina; así como su morfología microscópica (cocos esféricos, Gram positivos, no esporulados. Se evaluaron la pureza de los cultivos mediante coloración Gram.

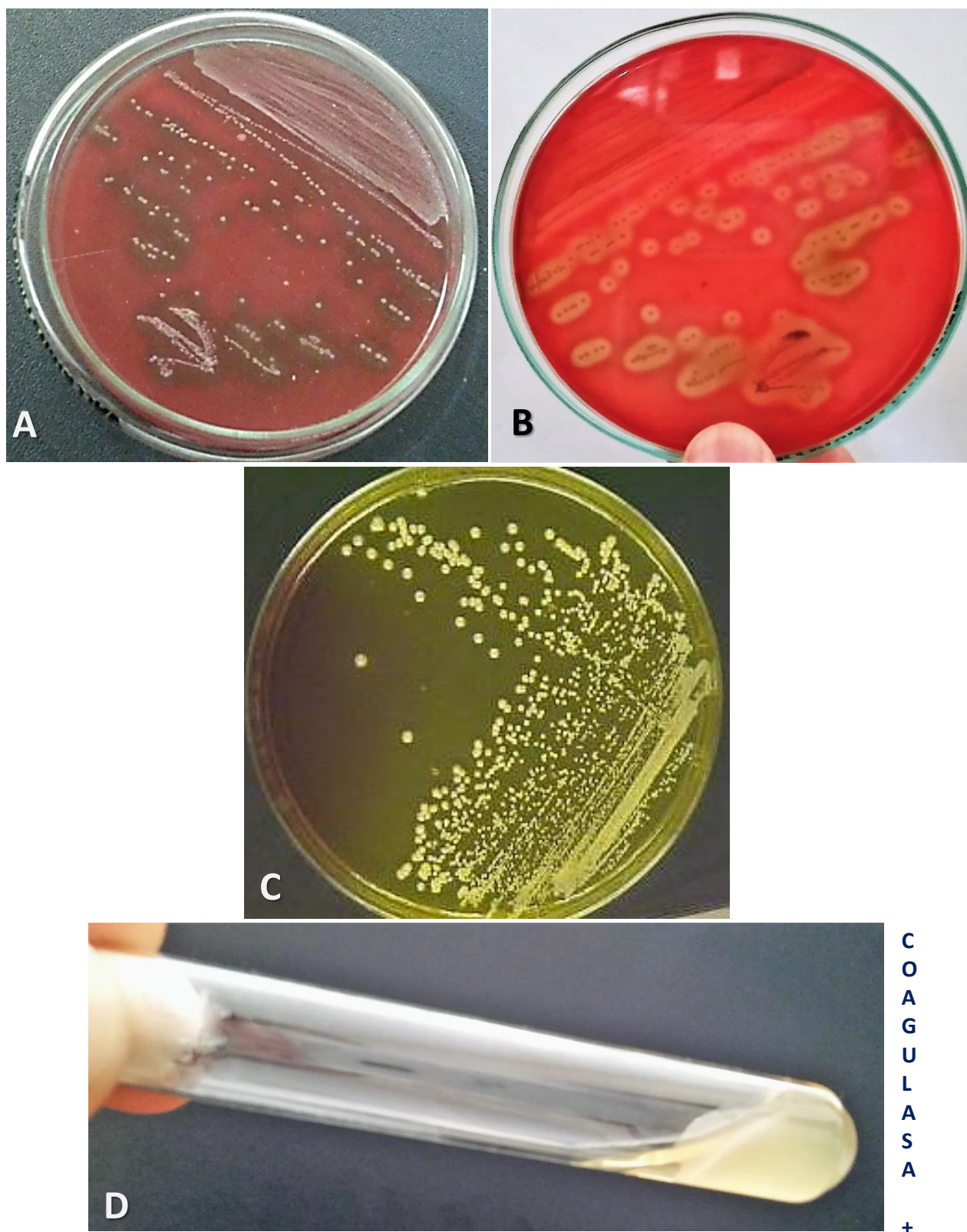
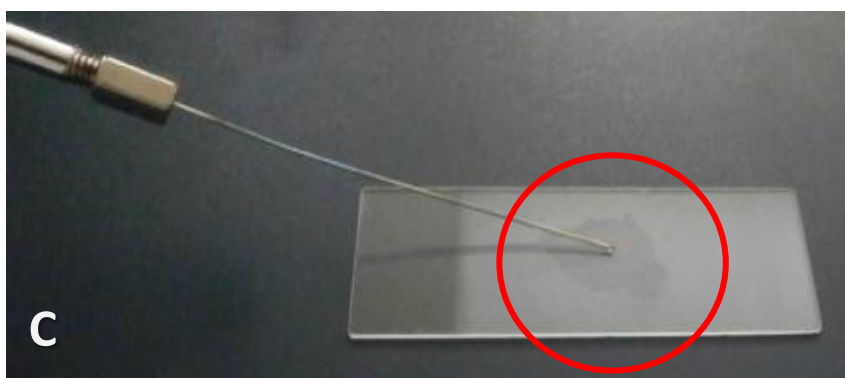
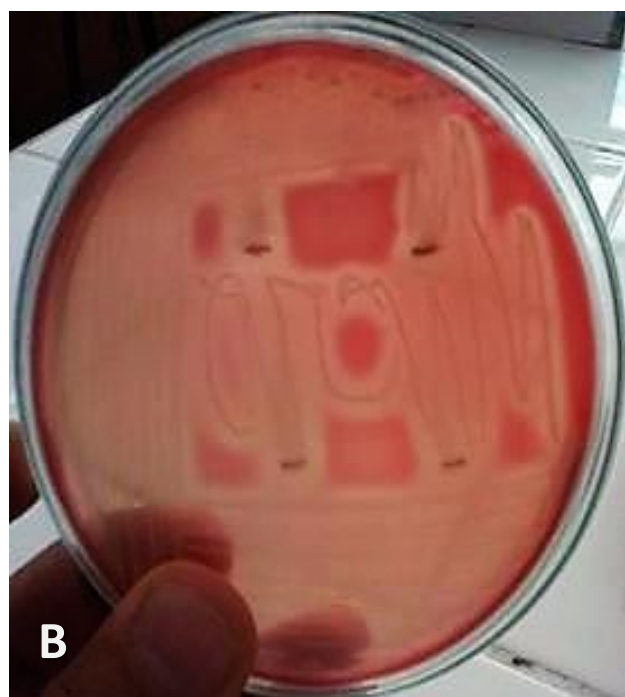


Figura 5: Aislamiento e Identificación de *Staphylococcus aureus*. **A.** Identificación de cepas en Agar Sangre. **B.** Identificación de la β hemolisis. **C.** Prueba de la fermentación del manitol. **D.** Prueba de la coagulasa.



CATALASA –

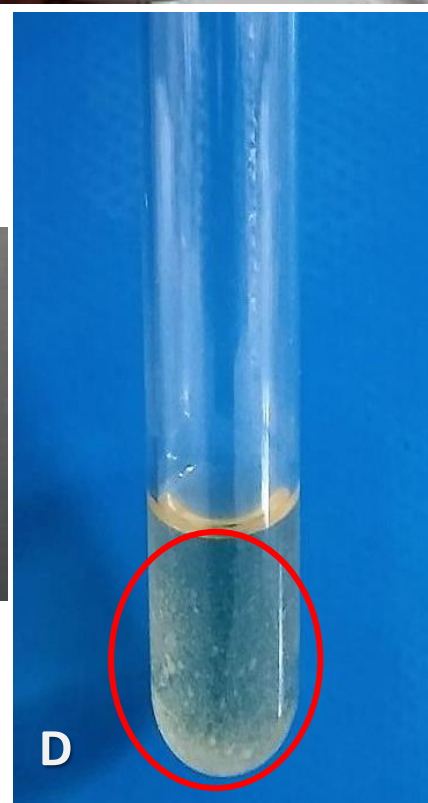


Figura 6: Aislamiento e Identificación de *Streptococcus* β -hemolítico. **A.** Identificación de la β – Hemolisis. **B.** Identificación de las características culturales. **C.** Prueba de la catalasa. (-) **D.** Crecimiento en el medio Caldo Tripticasa Soja

3.2.2. Obtención del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. (Herrera, 2013).

- Una vez recolectado las hojas de *Schinus molle* L. “molle” en el Campus de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional “Pedro Ruíz Gallo” en el departamento de Lambayeque en horas de la mañana, se llevaron al laboratorio de Microbiología Humana. En el laboratorio, se procedió a desinfestar las hojas con hipoclorito de sodio al 2% en agua, luego se enjuagó con agua destilada para eliminar el cloro residual, luego se procedió a escurrir y secar con toallas absorbentes, todas las hojas obtenidas se encuentran en perfectas condiciones edáficas y fitosanitarias.
- Las hojas de molle fueron deshidratadas en el horno (THELCO PRECISION), a temperatura de 37 °C, por 72 horas. El material seco, se sometió a trituración con ayuda de un mortero previamente esterilizado, donde se obtuvo la muestra en polvo.
- La muestra molida se colocó en un recipiente grande de vidrio de capacidad de 1000 ml aproximadamente. Al cual se agregó en cantidad doble el etanol al 96%, en proporción 1:2 (C/V) y se dejó macerar por 7 días en un lugar donde no tuvo contacto con la luz solar. Transcurrido ese tiempo, se procedió a filtrar con papel filtro Whatman N° 1 y se colocó en crisoles para permitir su evaporación y la obtención del extracto de las hojas de molle.

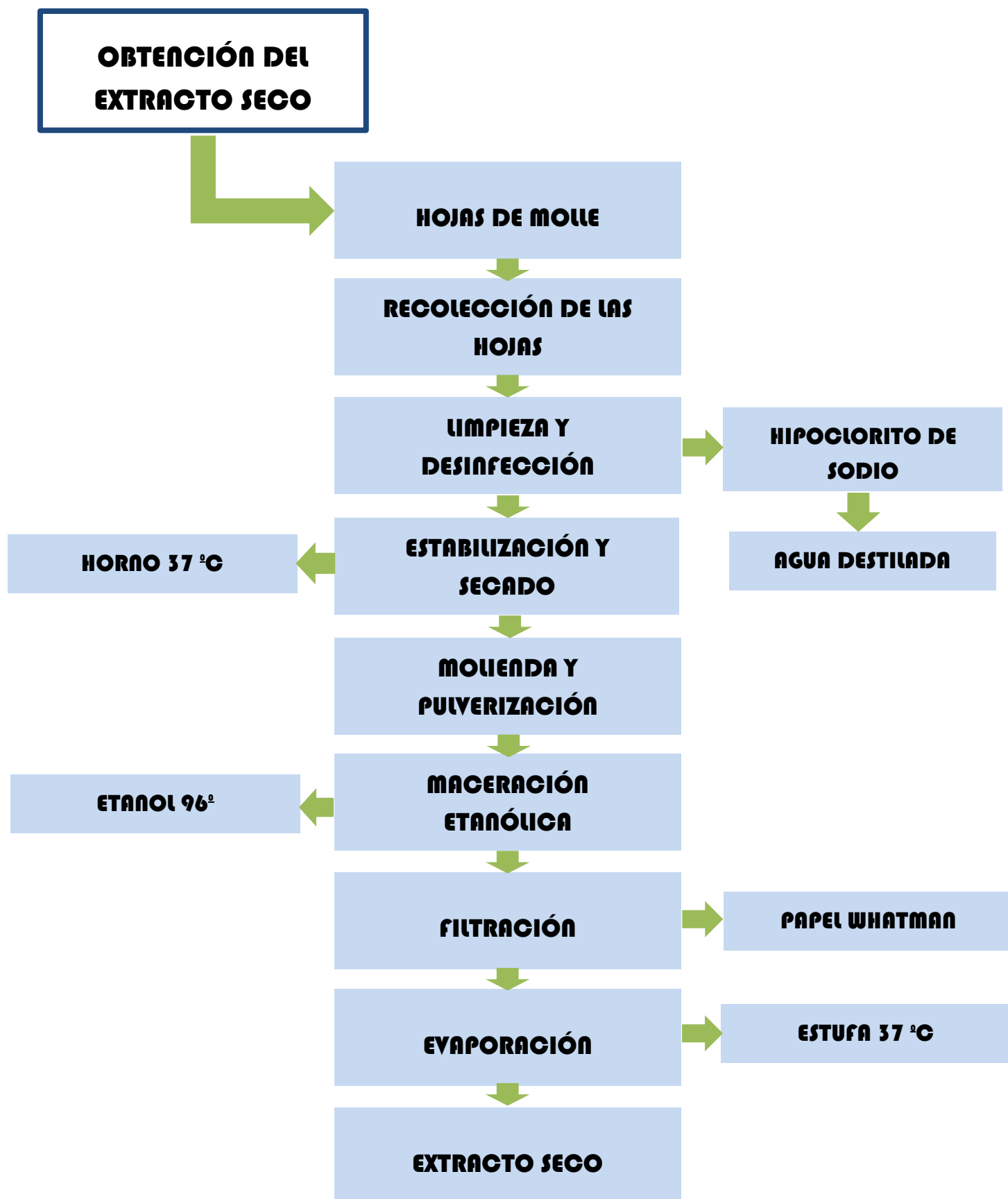


Figura 7: Diagrama de obtención del extracto etanólico de *Schinus molle* L.



Figura 8: Elaboración del extracto etanólico de *Schinus molle* L. **A.** Hojas secadas en horno. **B.** Trituración de hojas secas en mortero. **C, D, E.** Maceración de las hojas pulverizadas. **F, G.** Filtrado del macerado de hojas. **H.** Extracto de *Schinus molle* L. en la estufa para la evaporación del alcohol. **I.** Extracto seco de *Schinus molle* L.

3.2.3. Concentraciones del extracto etanólico de *Schinus molle* L. (molle).

La solución madre se preparó a partir de 5 gramos de extracto etanólico de *Schinus molle* L. fue diluido y llevado a 5 mL de alcohol al 40 %, obteniéndose una concentración de 1000 mg/mL. A partir de esta solución madre se procedió a realizar las respectivas diluciones sucesivas hasta obtener concentraciones de 125 mg/mL, 250 mg/mL, 500 mg/mL, 750 mg/mL, 1000 mg/mL (Tabla 01). Tomando un volumen de la solución stock y completando con etanol al 40 %.

Tabla 1: Concentraciones del extracto etanólico de *Schinus molle* L.

Solución madre(mL)	Alcohol 40% (mL)	Concentración(mg/mL)
2	0	1000 ⁽⁺⁾
1.5	0.5	750
1	1	500
0.5	1.5	250
0.25	1.75	125

(+) Concentración de la solución madre.

3.2.4. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. (molle).

Se procedió a enfrentar los extractos ya listos frente al crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico siguiendo una serie de pasos que se detallará a continuación.

A. Preparación del inóculo bacteriano según método descrito por el Instituto Nacional de Salud del Perú (INS).

Para la preparación del inóculo bacteriano según el Manual de procedimientos para pruebas de susceptibilidad del INS, 2010 donde se utilizó solución salina fisiológica esterilizada (NaCl 0,86 % p/v) como diluyente para 1 o 2 colonias del cultivo bacteriano puro del que

se hizo la estandarización hasta obtener una densidad poblacional semejante al tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland equivalente a 1.5×10^8 UFC / mL.

B. Preparación de discos de susceptibilidad.

Se utilizó el papel Whatman N° 01 con el cual se obtuvieron discos de 5 mm de diámetro con ayuda de un perforador. Estos discos se colocaron dentro de viales y se esterilizaron en autoclave (15 Lb. de presión a 121 °C por 15 minutos) para luego secarlos en horno a 80 °C por 24 horas.

Una vez esterilizados, los discos, se inocularan con 20 µl de cada una de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "MOLLE" (125 mg/mL, 250 mg/mL, 500 mg/mL, 750 mg/mL, 1000 mg/mL), se dejaron reposar por 5 minutos para luego ser utilizados en la prueba de susceptibilidad. Se utilizó como control negativo discos embebidos en etanol al 40°.

C. Evaluación de la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β-hemolítico frente al extracto etanólico de *Schinus molle* L., según el método modificado de disco difusión (Kirby Bauer).

Se prepararon placas de Agar Müller Hinton (entre 10 mL. a 15 mL. por placa) para cada uno de los microorganismos empleados en la investigación: *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β-hemolítico. Después de haber pasado el control de esterilidad.

Se sembraron con un hisopo de algodón esterilizado por diseminación sobre la superficie del Agar Müller Hinton de tal manera que el crecimiento bacteriano cubra la superficie del agar, y se dejó secar durante cinco minutos. En el caso de *Streptococcus* β-hemolítico el agar Müller Hinton es modificado con suero de sangre al 1%. Y luego

se colocaron los discos embebidos con cada una de las concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. y en el centro se colocó el disco de control con etanol al 40 % con pinzas estériles a una distancia de 25 mm uno del otro, y se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Transcurrido el período de incubación se procedió a la evaluación midiéndose los diámetros de las zonas de inhibición completa (halos – mm), con una regla milimetrada. Se registró la medida de cada una de las cepas, con estas medidas se obtuvo la medida promedio de los halos de inhibición que se observaron en el efecto del extracto y se utilizaron en el análisis estadísticos de datos.

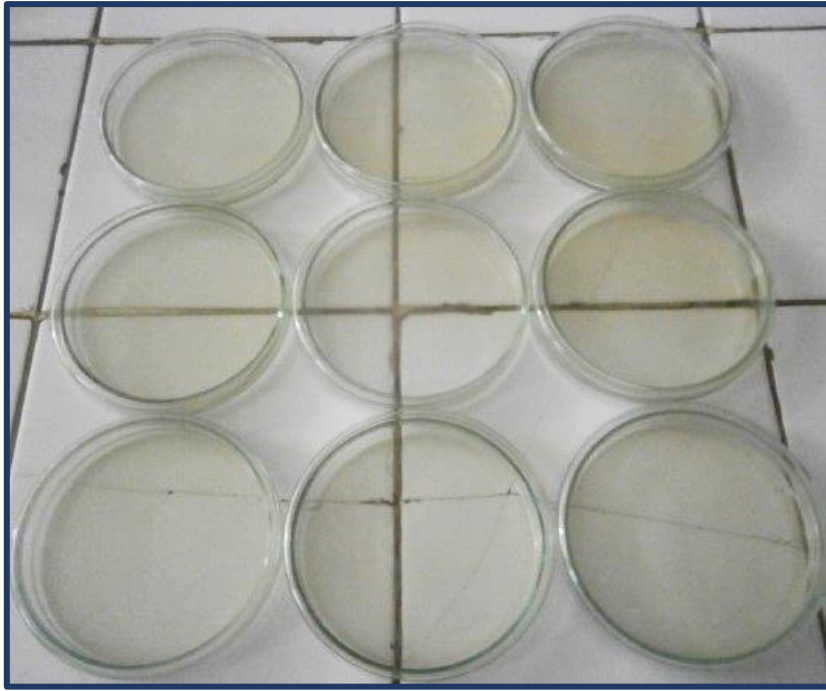


Figura 10: Placas de Petri con Agar Müller Hinton para la prueba de Susceptibilidad bacteriana.



Figura 9: Siembra en la superficie de la placa de Agar Müller Hinton con el inóculo de cada cepa incubado durante 24 horas.

3.2.5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico. Método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del INS.

Adecuamos la técnica según el Manual de procedimientos para pruebas de susceptibilidad del INS, 2010 donde se diluyó a partir de la concentración que tuvo menos efecto inhibitorio, así es como se hicieron diluciones hasta obtener concentraciones decrecientes del extracto (Tabla 02), las cuales fueron 125 mg/mL, 62.5 mg/mL, 31.25 mg/mL, 15.62 mg/mL y 7.81 mg/mL en tubos con Caldo Trypticase Soja. A un tubo con Caldo Trypticase Soja no se le inoculó y lo tomamos como control de esterilidad y otro con el microorganismo sin añadirle el extracto como control del inóculo.

Después de un período de 18 a 24 horas de incubación a 37⁰ C se observó si hubo crecimiento o no en base a la turbidez de los tubos lo que indica el desarrollo bacteriano.

Tabla 2: Resumen del procesamiento para realizar la macrodilución en caldo.

CONCENTRACION (mg/mL)	TUBO 1 125	TUBO 2 62.5	TUBO 3 31.25	TUBO 4 15.62	TUBO 5 7.81	TUBO 6 C.I.	TUBO 7 C.E.
CALDO TRIPTICASA SOJA mL.	0.5	0.5	0.5	0.5	-	0.5	0.5
Solución del extracto etanólico <i>Schinus molle</i> L.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-
Inóculo <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus</i> β- hemolítico.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-
Volumen final	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5

C.I.= Control de inóculo

C.E. = Control de esterilidad

3.3. DISEÑO DE CONTRASTACIÓN:

El Diseño de Investigación utilizado fue el de estímulo creciente, descrito por **GOODE y HATT (1976)**. Siendo los grupos experimentales cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico al cual se les aplicó el estímulo creciente que consistió en las diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L.

Según este diseño la variable independiente estuvo constituida por las concentraciones del extracto etanólico (125 mg/ml, 250 mg/ml, 500 mg/ml, 750 mg/ml, 1000 mg/ml) y la variable dependiente, por el diámetro de los halos de inhibición, en milímetros, de las cepas de los microorganismos (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico).

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS:

El análisis estadístico de los datos, obtenidos en la experimentación correspondiente, se realizó por medio de Análisis de Varianza (ANAVA), con arreglo factorial (5 \times 6 \times 3); donde cinco es el número de concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. (125 mg/ml, 250 mg/ml, 500 mg/ml, 750 mg/ml, 1000 mg/ml), seis es el número de cepas de cultivo puro de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico y tres es el número de repeticiones, lo que nos da un total de 90 unidades muestrales ; en donde se observó el grado de susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico cuando fueron expuestas a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L., este análisis se complementó con la Prueba discriminatoria de Tukey a 0,05 nivel de significación (STELL y TORRIE, 1983). Con la finalidad de determinar las diferencias entre cada uno de los factores.

El procesamiento estadístico se realizó con ayuda del software estadístico: Statística versión 6.0 y Excel 2013.

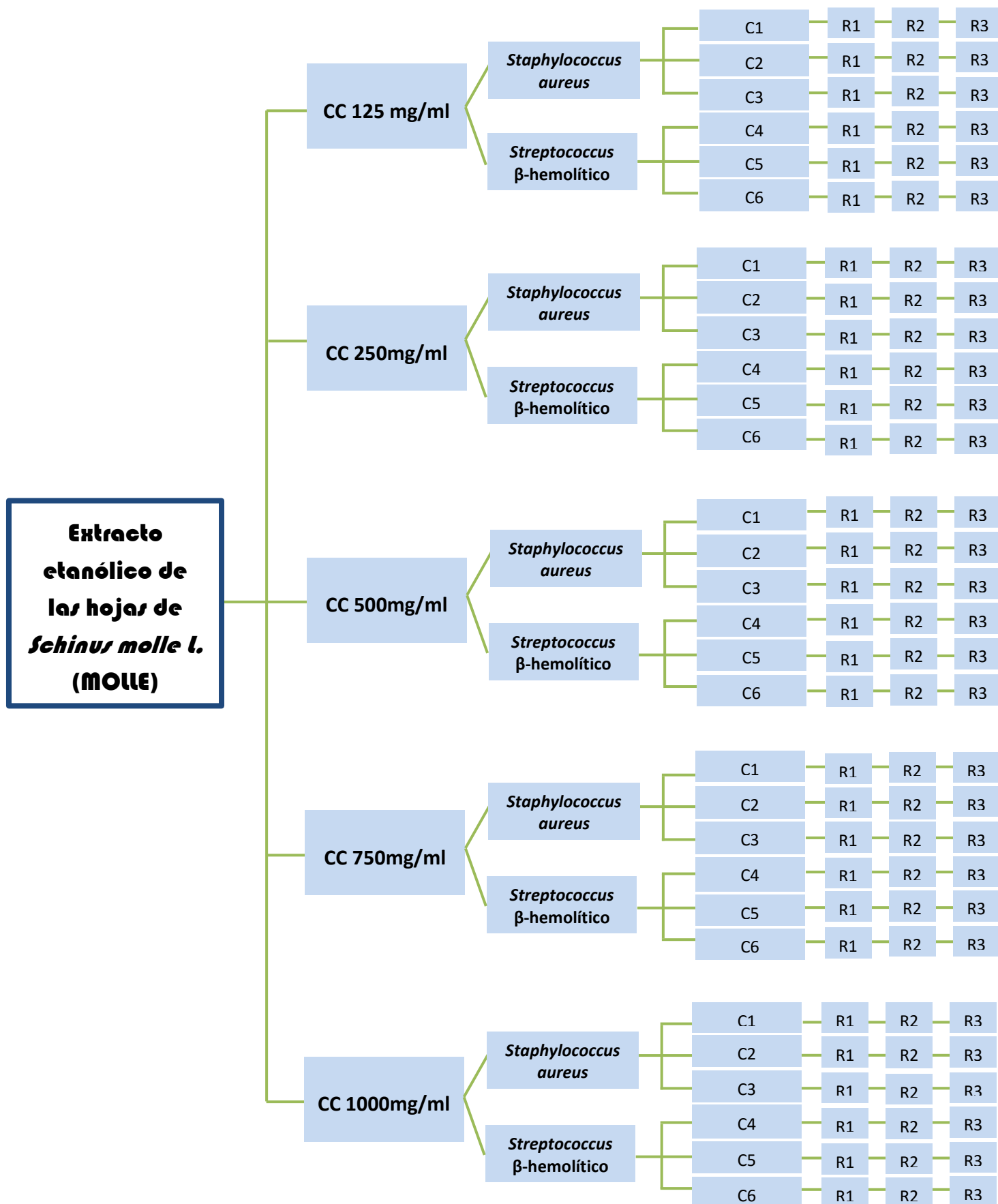


Figura 11: Diseño experimental para determinar la susceptibilidad de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus β-hemolítico* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L.

IV. RESULTADOS

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar la Susceptibilidad de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L., lo cual se evidenció por la presencia de halos de inhibición medidos en milímetros, los resultados se muestran a continuación en tablas y gráficos con su interpretación correspondiente.

4.1. SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS *Staphylococcus aureus* Y *Streptococcus* β -HEMOLÍTICO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Schinus molle* L.

4.1.1. Promedio de los diámetros de halos de las cepas *Staphylococcus aureus*.

Los valores obtenidos demostraron que todas las cepas *Staphylococcus aureus* en estudio fueron susceptibles al extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L., encontrándose algunas diferencias en el comportamiento de las cepas, debido a que fueron enfrentadas a diferentes concentraciones del extracto.

Se obtuvieron los promedios del diámetro en mm de los halos de inhibición para todas las cepas de *Staphylococcus aureus*, de tal manera que para la SA1 de *Staphylococcus aureus*, se observó que la menor concentración (125 mg/mL) alcanzó un promedio de 5.6 mm de inhibición y la concentración mayor (1000 mg/mL) alcanzó un promedio de 14.6 mm de inhibición.

La SA2 de *Staphylococcus aureus*, la menor concentración (125 mg/mL) obtuvo un promedio de inhibición de 5.3 mm, y la concentración mayor (1000 mg/ mL) obtuvo un promedio de inhibición de 14 mm.

La SA3 de *Staphylococcus aureus*, la menor concentración (125 mg/mL) obtuvo un promedio de inhibición de 5.3 mm, y la concentración mayor (1000 mg/ mL) obtuvo un promedio de inhibición de 14.6 mm.

Tabla 3: Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Schinus molle* L.

Cepas <i>Staphylococcus aureus</i>	Concentración	Media	Total
SA - 1	K - 125	5.66667	9.60000
	K – 250	7.66667	
	K – 500	9.00000	
	K – 750	11.00000	
	K - 1000	14.66667	
SA - 2	K - 125	5.33333	10.26666
	K – 250	8.66667	
	K – 500	11.00000	
	K – 750	12.33333	
	K - 1000	14.00000	
SA - 3	K - 125	5.33333	10.73331
	K – 250	9.33333	
	K – 500	11.33333	
	K – 750	13.00000	
	K - 1000	14.66667	

4.1.2. Promedio de los diámetros de halos de las cepas *Streptococcus* β – hemolítico.

Las cepas de *Streptococcus* β – hemolítico en estudio fueron susceptibles al extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L., encontrándose algunas diferencias en el comportamiento de las cepas, debido a que fueron enfrentadas a diferentes concentraciones del extracto. La BH1 de *Streptococcus* β – hemolítico se observa que el promedio de halos para la menor concentración (125 mg/mL) es 7.3 mm, mientras que la mayor concentración (1000 mg/mL) obtuvo un promedio de inhibición de 15 mm.

La BH2 de *Streptococcus* β – hemolítico, la menor concentración (125 mg/mL) obtuvo un promedio de inhibición de 8 mm, y la mayor concentración (1000 mg/mL) obtuvo un promedio de inhibición de 17 mm.

La BH3 de *Streptococcus* β – hemolítico, la menor concentración (125 mg/mL) obtuvo un promedio de inhibición de 7.6 mm, y la mayor concentración (1000 mg/mL) obtuvo un promedio de inhibición de 15.6 mm.

Tabla 4: Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de *Streptococcus* β -hemolítico a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Schinus molle* L.

Cepas <i>Streptococcus</i> β - Hemolítico	Concentración	Media	Total
BH - 1	K - 125	7.33333	10.80000
	K – 250	8.33333	
	K – 500	10.66667	
	K – 750	12.66667	
	K - 1000	15.00000	
BH - 2	K - 125	8.00000	12.13333
	K – 250	10.00000	
	K – 500	11.66667	
	K – 750	14.00000	
	K - 1000	17.00000	
BH - 3	K - 125	7.66667	11.46666
	K – 250	9.33333	
	K – 500	11.66667	
	K – 750	13.00000	
	K - 1000	15.66667	

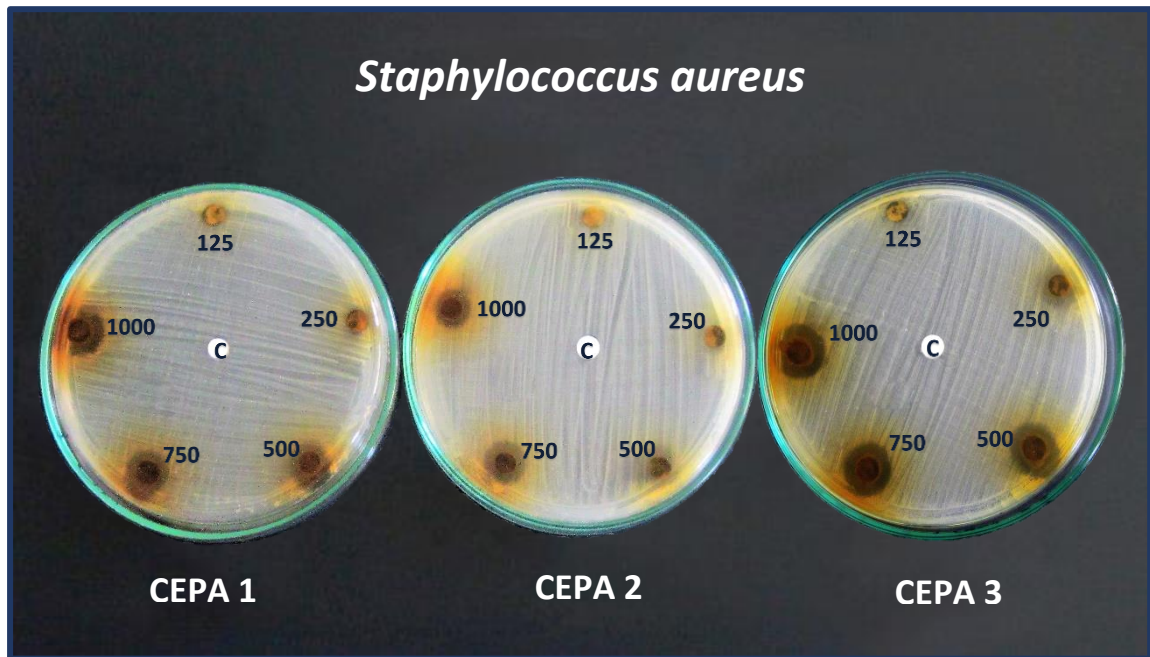


Figura 12: Susceptibilidad de cepas de *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L.

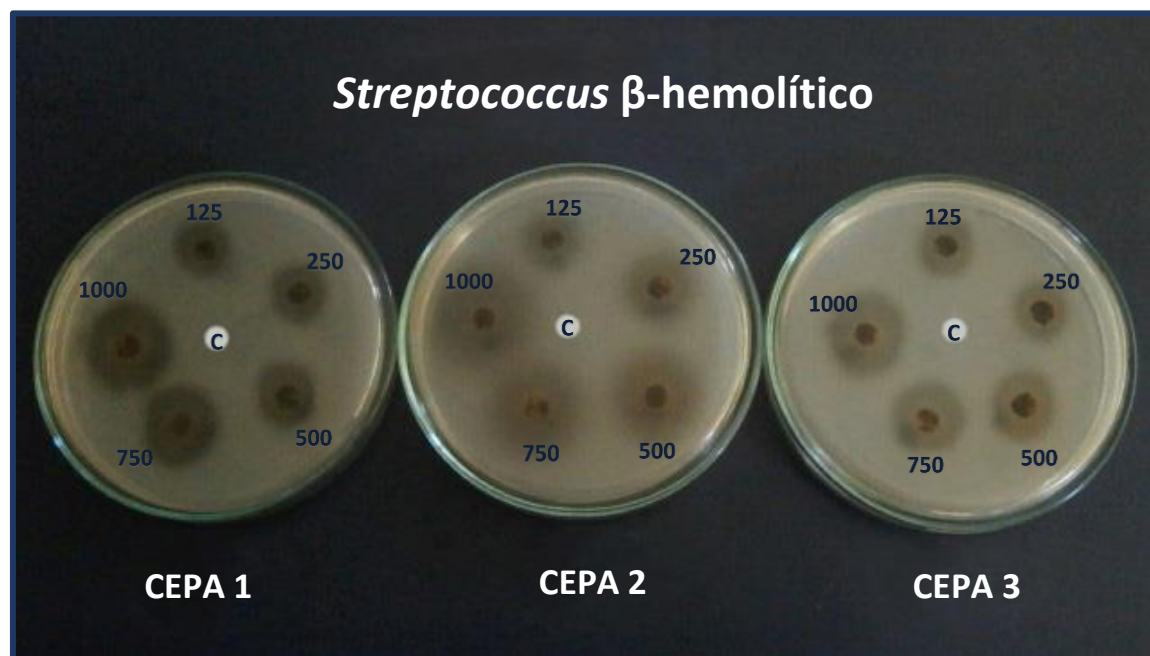


Figura 13: Susceptibilidad de cepas de *Streptococcus* β -hemolítico a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L.

4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

4.2.1. Análisis estadístico de *Staphylococcus aureus*.

Al realizar el Análisis de varianza de la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Schinus molle* L., se concluye que solo la variable concentración, presenta diferencias estadísticas significativas, rechaza la hipótesis (Tabla 5). De tal manera que los resultados permiten observar que las variable concentración, influye significativamente en la efectividad del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. sobre la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus*.

HIPÓTESIS:

Cepas:

H_{01} = Cepa SA1 = Cepa SA2 = Cepa SA3

Concentración:

H_{02} = K 125 = K 250 = K 500 = K 750 = K 1000

Interacciones:

H_{03} = No existen efecto de interacciones entre las cepas de *Staphylococcus aureus* y las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Schinus molle* L.

Tabla 5: Análisis de varianza de la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Schinus molle* L.

Origen	SC	GL	CM	F	Sig.	Decisión
Cepa <i>Staphylococcus aureus</i>	9.733	2	4.867	2.126	0.136914	Aceptar H_{01}
Concentración	423.422	4	105.856	46.248	0.000000	Rechazar H_{02}
Cepa <i>Staphylococcus aureus</i> *Concentración	11.378	8	1.422	0.621	0.753080	Aceptar H_{03}
Error	68.667	30	2.289			

S.C.= Suma de Cuadrados

G.L.= Grados de Libertad

C.M. = Cuadrado Medio

⊙ VARIABLE: CONCENTRACIÓN.

Por medio de la prueba de Tukey (0.05) se demostró estadísticamente la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* al ser expuesta a las diferentes concentraciones (Cc. 125 mg/ mL, Cc. 250 mg/mL, Cc. 500 mg/mL, Cc. 750 mg/mL, Cc. 1000 mg/mL) del extracto etanólico de *Schinus molle* L. Se determinó que existen diferencias significativas entre las diferentes concentraciones (Tabla 6).

De tal manera se pudo afirmar que a medida que aumenta la concentración del extracto etanólico, existe también mayor susceptibilidad de las cepas de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 6: Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de *Staphylococcus aureus* a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Schinus molle* L.

Concentración	Promedio (Halo – mm)	Significancia ($\alpha=0.05$)	
K - 125	5.44444	a	
K - 250	8.55556	b	
K - 500	10.44444	b	c
K - 750	12.11111		c
K - 1000	14.44444		d

- **Letras diferentes** = Diferencia significativa
- **Letras iguales** = No existe diferencia significativa

4.2.2. Análisis estadístico de *Streptococcus* β – hemolítico.

Al realizar el Análisis de varianza de la susceptibilidad de *Streptococcus* β – hemolítico a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Schinus molle* L., se concluye que las variables cepa y concentración, presentan diferencias estadísticas significativas, rechazan las hipótesis (Tabla 7). De tal manera que los resultados permiten observar que las variables cepa y concentración, influyen

significativamente en la efectividad del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. sobre la susceptibilidad de *Streptococcus* β – hemolítico.

HIPÓTESIS:

Cepas:

H_{01} = Cepa BH1 = Cepa BH2 = Cepa BH3

Concentración:

H_{02} = K 125 = K 250 = K 500 = K 750 = K 1000

Interacciones:

H_{03} = No existen efecto de interacciones entre las cepas de *Streptococcus* β - hemolítico y las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Schinus molle* L.

Tabla 7: Análisis de varianza de la susceptibilidad de *Streptococcus* β - hemolítico a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Schinus molle* L.

Origen	SC	GL	CM	F	Sig.	Decisión
Cepa <i>Streptococcus</i> β - Hemolítico	13.333	2	6.667	3.333	0.049289	Rechazar H_{01}
Concentración	379.200	4	94.800	47.400	0.000000	Rechazar H_{02}
Cepa <i>Streptococcus</i> β - Hemolítico*Concentración	2.667	8	0.333	0.167	0.993792	Aceptar H_{03}
Error	60.000	30	2.000			

S.C.= Suma de Cuadrados

G.L.= Grados de Libertad

C.M. = Cuadrado Medio

⊙ VARIABLE: CEPA *Streptococcus* β – hemolítico.

Al realizar la prueba de significancia de Tukey (0.05) a los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de *Streptococcus* β – hemolítico frente al extracto etanólico de *Schinus molle* L., para el factor cepas (BH1, BH2,

BH3) se demostró estadísticamente que la cepa BH1 y BH3 presentaron comportamiento similar, de la misma manera que las cepas BH2 y BH3; sin embargo se evidenció que existe diferencia entre las cepas BH1 y BH2 (Tabla 8). Se determinó el grado de susceptibilidad de cada cepa de *Streptococcus* β – hemolítico, frente al extracto de *Schinus molle* L. sin tener en consideración las diferentes concentraciones.

Tabla 8: Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de *Streptococcus* β - hemolítico a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Schinus molle* L.

Cepa <i>Streptococcus</i> β - Hemolítico	Promedio (Halo – mm)	Significancia ($\alpha=0.05$)	
BH1	10.80000	a	
BH3	11.46667	a	b
BH2	12.13333		b

- **Letras diferentes** = Diferencia significativa
- **Letras iguales** = No existe diferencia significativa

☉ VARIABLE: CONCENTRACIÓN.

Por medio de la prueba de Tukey (0.05), se demostró estadísticamente la susceptibilidad de *Streptococcus* β – hemolítico al ser expuesta a las diferentes concentraciones (Cc. 125 mg/ mL, Cc. 250 mg/mL, Cc. 500 mg/mL, Cc. 750 mg/mL, Cc. 1000 mg/mL) del extracto etanólico de *Schinus molle* L. Se determinó que existen diferencias significativas entre las diferentes concentraciones (Tabla 9). De esta manera se pudo afirmar que a medida que aumenta la concentración del extracto etanólico, existe también mayor susceptibilidad de las cepas de *Streptococcus* β – hemolítico.

Tabla 9: Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de *Streptococcus* β - hemolítico a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Schinus molle* L.

Concentración	Promedio (Halo – mm)	Significancia ($\alpha=0.05$)
K - 125	7.66667	a
K - 250	9.22222	a
K - 500	11.33333	b
K - 750	13.22222	b
K - 1000	15.88889	c

- **Letras diferentes** = Diferencia significativa
- **Letras iguales** = No existe diferencia significativa

4.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Schinus molle* L. (MOLLE) SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* Y *Streptococcus* β – hemolítico.

Para determinar la Concentración mínima inhibitoria del extracto de la hojas de *Schinus molle* L. (MOLLE) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β – hemolítico, se trabajó el método de macrodilución en tubo aplicado según Norma Técnica Peruana N°30 del INS.

Para la realización del experimento, se utilizaron tres cepas de *Staphylococcus aureus* y tres cepas de *Streptococcus* β – hemolítico (SA1, SA2, SA3, BH1, BH2, BH3) y la concentración 125 mg/mL del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L., se trabajó con dicha concentración debido a que fue la menor concentración que ejerció susceptibilidad sobre todas las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β – hemolítico en estudio.

Para la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria, se tuvo en cuenta si hubo crecimiento o no de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β – hemolítico en los tubos

en que se realizaron las diluciones del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. (Cc. 125 mg/mL).

Se pudo observar la susceptibilidad de cada una de las cepas, y se obtuvo como resultado que para la SA1, SA2 y SA3 (*Staphylococcus aureus*) la concentración mínima que no permite su desarrollo visible es 62.5 mg/mL, sin embargo para la BH1 (*Streptococcus* β – Hemolítico) la concentración mínima que impide su desarrollo es 15.62 mg/mL, a diferencia de las BH2 y BH3 (*Streptococcus* β – Hemolítico) cuya Concentración Mínima Inhibitoria es 7.81 mg/mL, lo cual se observa en la Tabla N° 10.

Tabla 10: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β - hemolítico.

CEPAS	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Streptococcus</i> β - Hemolítico		
	SA1	SA2	SA3	BH1	BH2	BH3
Control positivo*	—	—	—	—	—	—
Control negativo**	+	+	+	+	+	+
125 mg/mL	—	—	—	—	—	—
62.5 mg/mL	—	—	—	—	—	—
31.25 mg/mL	+	+	+	—	—	—
15.62 mg/mL	+	+	+	—	—	—
7.81 mg/mL	+	+	+	+	—	—

(*) Caldo
(**) Caldo + inóculo

(+) Crecimiento
(–) No hay crecimiento

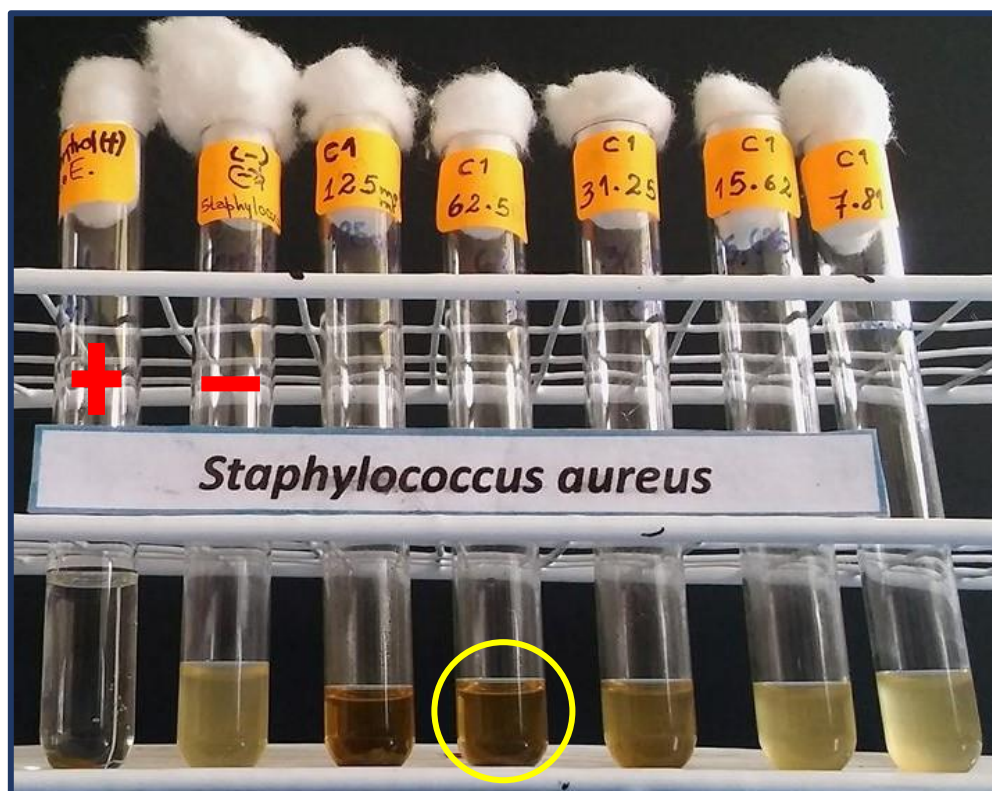


Figura 14: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. Cepa 1.

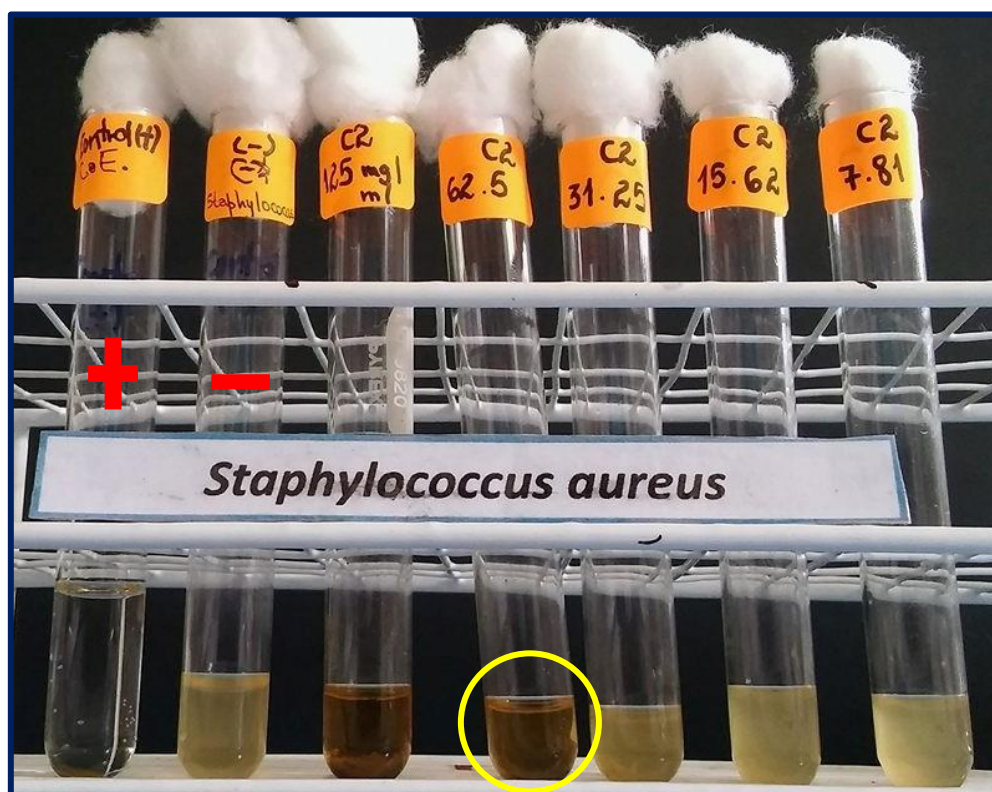


Figura 15: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. Cepa 2.

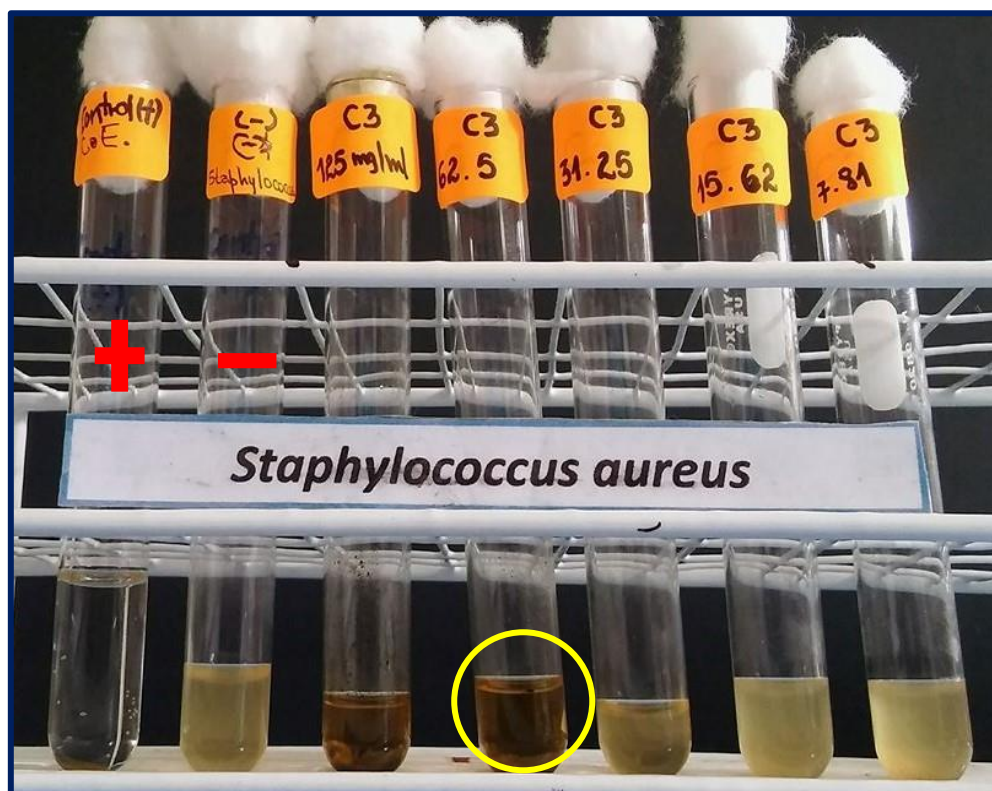


Figura 16: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. Cepa 3.

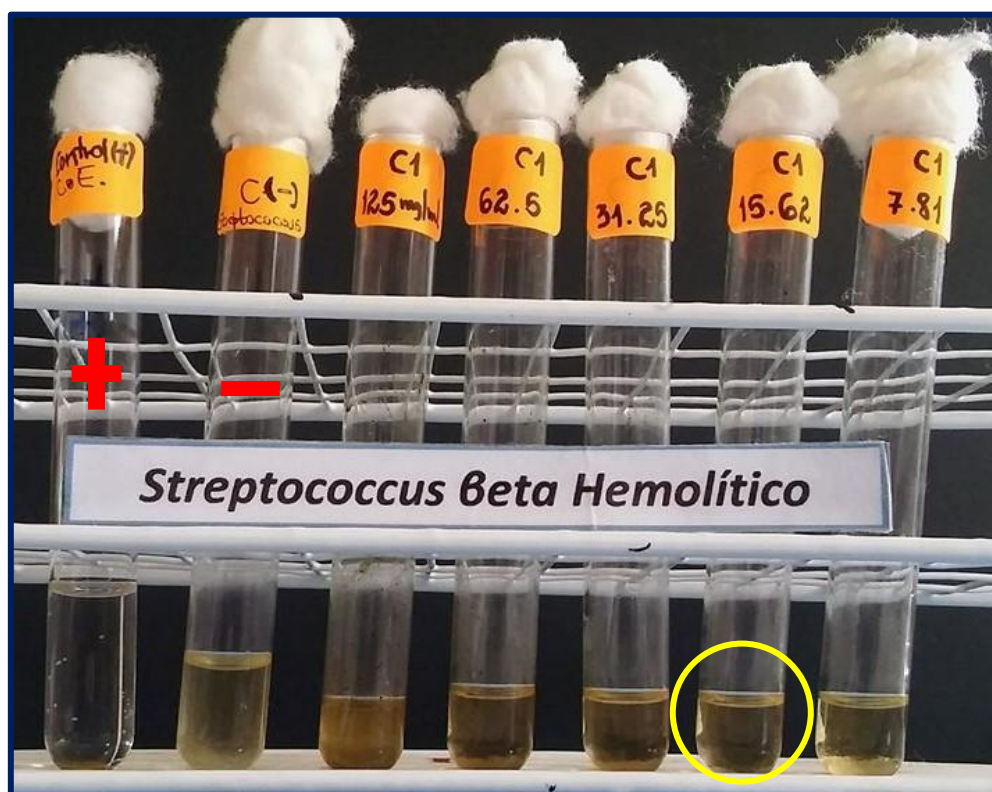


Figura 17: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L sobre cepas de *Streptococcus* β -hemolítico. Cepa 1.

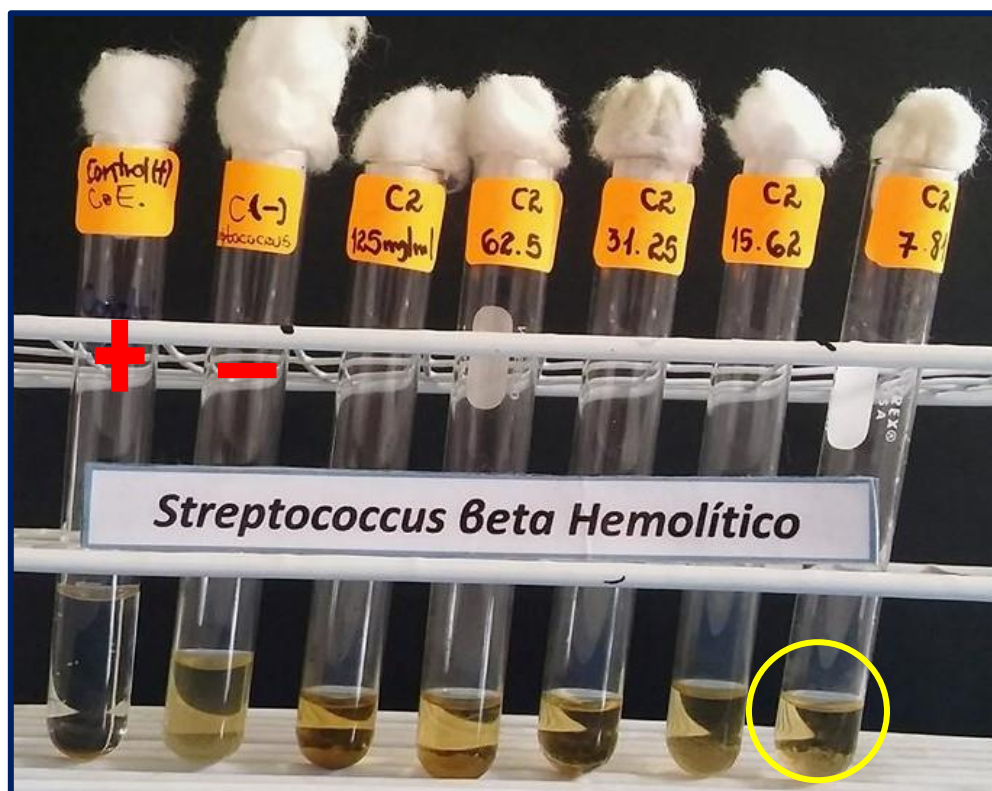


Figura 18: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. sobre cepas de *Streptococcus* β -hemolítico. Cepa 2.

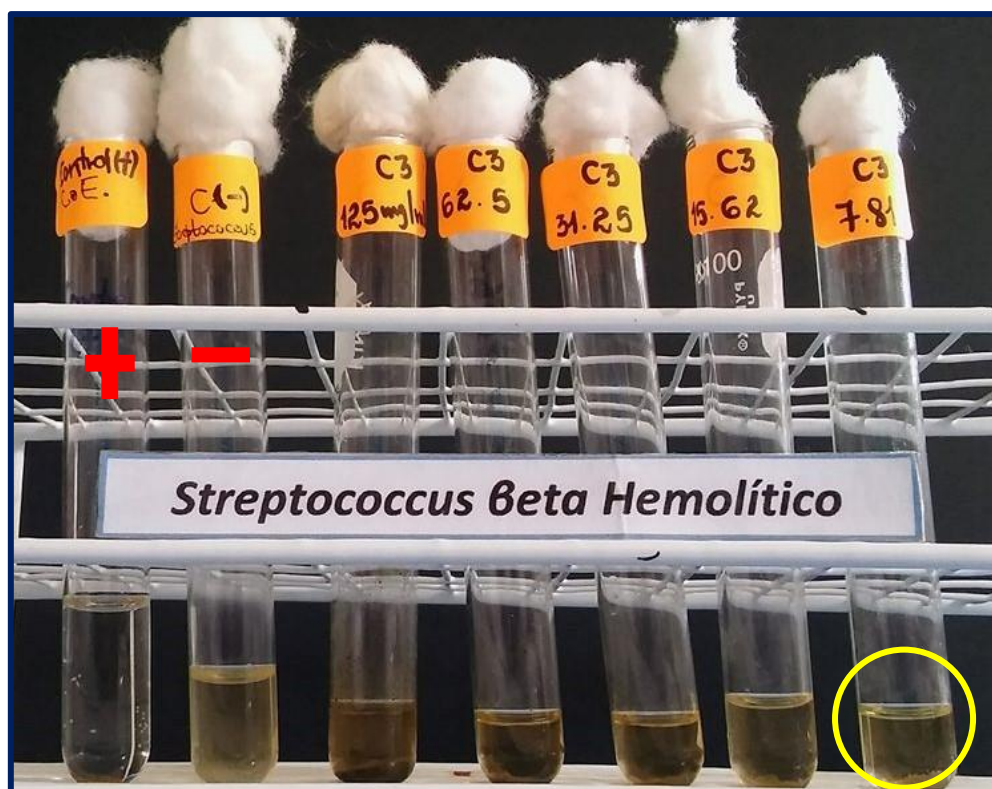


Figura 19: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. sobre cepas de *Streptococcus* β -hemolítico. Cepa 3.

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se determina la susceptibilidad de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “molle”, el cual busca contribuir con el desarrollo de nuevas alternativas en la terapia antibacteriana.

Con los resultados obtenidos nos indican que el extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. ejerce actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico, con halos de inhibición que oscilan entre 5.3 - 14.6 mm; 7.3 – 17.0 mm respectivamente. Nuestros resultados coinciden con (Pérez, 2005; Garay *et al.*, 2016; Herrera 2013; Gualtieri *et al.*, 2012 y Cruz *et al.*, 2010) quienes demostraron que el extracto etanólico de molle tiene propiedades antibacterianas frente a bacterias gram positivas ya que éstas muestran mayor sensibilidad a los productos en función a la mayor permeabilidad que ofrecen sus envolturas (pared celular y membrana citoplasmática).

Estas propiedades del extracto etanólico de *Schinus molle* L. reside en su composición química, estudios fitoquímicos de *Schinus molle* L. han indicado que contiene taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas esferoidales, esteroides, terpenos y aceite esencial. El aceite esencial presente en las hojas contiene ácido behénico, bergamota, bicyclogermacreno, borneno, cadineno, cadinol, calacoreno, calamenediol, calamaneno, canfeno, carvacrol, ácido gálico, butirato de geraniol, limoneno, mirceno, ácido linoleico, ácido palmítico, entre otros. (Gonzalez, 2009; Herrera, 2013 y Dellacassa, 2010)

Los taninos son compuestos fenólicos cuya acción antimicrobiana se debe a su capacidad para desnaturalizar proteínas, inactivar adhesinas microbianas, enzimas, y formar complejos con la pared celular. (Herrera, 2013)

Los alcaloides, constituyen un grupo heterogéneo de bases nitrogenadas, la mayoría contiene un anillo aromático y su efecto antimicrobiano puede estar relacionado con la capacidad que presentan para inhibir la biosíntesis de ácidos nucleicos. (Herrera, 2013)

Los flavonoides, son pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbonado, tiene actividad antimicrobiana debida probablemente a su habilidad para formar complejos con las proteínas solubles y extracelulares y el complejo con la pared bacteriana. (Herrera, 2013)

Las saponinas poseen una importante actividad antibacteriana, debido a que reducen la tensión superficial y actúan sobre los lípidos de la membrana provocando alteraciones de las mismas, lo que conlleva a la muerte celular; para ello se sugiere la formación de complejos con el colesterol presente en la membrana. (Herrera, 2013)

Los posibles mecanismos de acción de los terpenos contenidos en los aceites esenciales puede deberse a su volatilidad y bajo peso molecular, de esta forma pueden atravesar estructuras de resistencia de la especie bacteriana fácilmente. Así, el daño a la membrana citoplasmática, promueve la formación de poros por los cuales difunden moléculas e iones (fundamentalmente K^+ y H^+), lo que finalmente compromete la viabilidad de la membrana. (Herrera, 2013)

Los aceites esenciales de *Schinus molle* L. son una mezcla de compuestos químicos que se encuentran en un 2% en las hojas y contienen: aldehído cinámico, mirceno, geraniol, borneno, cardineno, α – cadinol, calacoreno, calamenediol, calamaneno, canfeno, carvacrol, ácido gálico, butirato de geraniol, limoneno, ácido linoleico, ácido palmítico, α y β pineno, p – cimeno, α – felandreno, δ – cadineno y principalmente sabineno. (Herrera, 2013; Wimalaratne, 1999)

Considerando la gran variedad de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales de *Schinus molle* L. es muy probable que su actividad antimicrobiana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino la acción combinada de varios de ellos sobre distintas localizaciones de la célula. Algunos estudios demuestran que los componentes de menor proporción tienen un papel crítico en la actividad antimicrobiana, posiblemente debido a un efecto sinérgico entre ellos. (Herrera, 2013)

En el caso de las bacterias Gram positivas como *Streptococcus* β -hemolítico, los aceites esenciales de *Schinus molle* L. se introducen a través de los lípidos de la membrana

celular y mitocondrial, alterando su estructura y haciéndola más permeable. Como consecuencia tiene lugar una fuga de iones y de otros contenidos celulares, de forma más o menos intensa, que llevan a la muerte celular. (Herrera, 2013; Lannacone y Alvariño, 2010). Y en el caso de *Staphylococcus aureus* su pared celular está formada principalmente por peptidoglucano y una menor proporción de proteínas, ac. Teicoicos y lipoteicoicos; así mismo su pared celular presentan poros que facilitan el ingreso de sustancias polares al interior de la célula en donde actúa los principios activos de los extractos. (Romero y Villegas, 2017).

La actividad biosida del extracto etanólico de *Schinus molle* L. ha sido probada en varios microorganismos como *Enterococcus faecalis*, *S. mitis*, *S. sobrinus*, *S. sanguis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, hongos como *Cándida albicans* y *Aspergillus niger* datos proporcionados por (Pauli, 2001; Gonzalez, 2009; Gualtieri *et al.*, 2012; Molinari, 2013 y Carvalho, 2013); sin embargo, en esta investigación se comprobó los efectos antimicrobianos sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico (*S. pyogenes*), similar al estudio de (Cruz *et al.*, 2010; Herrera, 2013 y Gualtieri *et al.*, 2012) el cual se obtuvo efectos antimicrobianos positivos utilizando el extracto etanólico de *Schinus molle* L., dichos resultados se comprobaron en éste estudio, por lo que se enriqueció el efecto antimicrobiano de esta especie.

Realizando el ANAVA encontramos que existen diferencias significativas entre las concentraciones empleadas en ambas especies estudiadas, observándose que a medida que las concentraciones aumentan los diámetros de halo de inhibición se incrementan y esto se debe que a mayor concentración se encuentran en mayor porcentaje los principios activos.

Respecto a los microorganismos, se demuestra que *Streptococcus* β -hemolítico posee una mayor sensibilidad que *Staphylococcus aureus* asumiéndose por un lado a la presencia de proteína M y ácido lipoteicoico en mayor proporción en su pared celular donde la cepa BH2, la de mayor sensibilidad (12.13 mm de halo) comparada con BH1 que alcanzó un halo de inhibición de 10.80 mm (mayor resistencia), respecto a *Staphylococcus aureus* (SA1 9.60 mm, SA2 10.26 mm y SA3 10.73 mm) las cepas de esta especie tuvieron un comportamiento de sensibilidad diferente frente al extracto

etanólico de molle, comprobándose esto con los resultados obtenidos por las cepas de *Staphylococcus aureus*, probablemente se deba a la estructura en particular de cada una de estas, ya que algunas cepas de *Staphylococcus aureus* poseen una cápsula (exopolisacárido), otras una cubierta polisacárida y otras ninguna de las estructuras mencionadas que actúa como barrera evitando el paso de compuestos dañinos a las células, como compuestos hidrofóbicos tóxicos (Koneman *et al.*, 2006). Además, tal como lo establecieron Echevarría y Zarate (2003) las pequeñas o grandes mutaciones del material genético bacteriano le confiere a estas, cambios en su estructura o en el modo de reaccionar a diversos compuestos químicos. Así mismo la comparación entre especies muestra una mayor sensibilidad de *Streptococcus* β -hemolítico al extracto etanólico que *Staphylococcus aureus*, lo que se justifica en su estructura de la pared celular de la primera especie constituida por peptidoglicano típico con puentes intercatenarios con un grado de entrecruzamiento del 50% menos que en *Staphylococcus aureus*, lo que facilita la difusión y la acción de los compuestos químicos presentes en el extracto etanólico de *Schinus molle* L. “molle”. Estas particularidades que presentan las bacterias mencionadas y que influyen en la resistencia o sensibilidad a los productos se confirma con los informes del Servicio del Laboratorio de Microbiología del Hospital Regional Docente Las Mercedes – Chiclayo, en los que las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas muestran mayor resistencia a los antimicrobianos a los cuales se enfrentan en las pruebas de sensibilidad (antibiograma). (Rodríguez *et al.*, 2014).

La CMI del extracto etanólico de *Schinus molle* L. frente a *Staphylococcus aureus* fue de 62.5 mg/mL y para *Streptococcus* β -hemolítico es 7.81 mg/mL corroborados por investigaciones realizadas (Cruz *et al.*, 2010; Romero y Villegas, 2017; Guerra, 2011). Estos resultados sugieren al extracto de molle como agente antimicrobiano prometedor.

VI. CONCLUSIONES

Al realizar el estudio sobre la Susceptibilidad de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. se concluye que:

1. Las cepas en estudio respecto a *Staphylococcus aureus* (SA1, SA2, SA3) son susceptibles al extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L., a concentraciones de 125 mg/mL, 250 mg/mL, 500 mg/mL, 750 mg/mL, 1000 mg/mL; lo cual fue por la presencia de halos de inhibición, notándose que la cepa más resistente fue la SA1 con un promedio de halo de inhibición de 9.60 mm y la más susceptible es la SA3 con un promedio de halo de inhibición de 10.7 mm.
2. *Streptococcus* β -hemolítico (BH1, BH2, BH3) también son susceptibles al extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L., a concentraciones de 125 mg/mL, 250 mg/mL, 500 mg/mL, 750 mg/mL, 1000 mg/mL; obteniéndose como la cepa más resistente la BH1 con un promedio de halo de inhibición de 10.8 mm y la cepa más susceptible es la BH2 con un halo de inhibición de 12.13 mm.
3. Con respecto a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. sobre cepas de *Staphylococcus aureus* se concluyó que tanto la cepa más resistente SA1 y la más susceptible SA3 son inhibidas a una concentración mínima de 62.5 mg/mL.
4. Sin embargo la CMI de las cepas de *Streptococcus* β -hemolítico; se concluye que la cepa más resistente BH1 es inhibida a una concentración de 15.62 mg/mL y la cepa más sensible BH2 se inhibió a una concentración de 7.81 mg/mL.

VII. RECOMENDACIONES

- Continuar con el trabajo de investigación, enfatizando en el estudio de los principios activos que posee *Schinus molle* L., evaluando así las múltiples propiedades que ofrece esta planta, además de realizar ensayos con otros microorganismos.
- Realizar otro tipo de extracto metanólico, hexánico, clorofórmico y acuoso a partir de la misma especie vegetal con la finalidad de verificar si su efectividad es mayor o menor que el extracto etanólico.
- Continuar con trabajos de investigación que nos permitan descubrir nuevos tratamientos con la finalidad de validar el uso de plantas medicinales.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Alfaro, M. (2015).** “Efecto inhibitorio in vitro de la infusión *Schinus molle* (molle) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*”. Tesis para optar el título profesional de Cirujano Dentista. UNIVERSIDAD SEÑOR DE SIPÁN.FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD. ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA, Pimentel – Perú.
2. **Aramburu, C.; Harbarth, S.; Liassine, N.; Girard, M.; Gervaix, A.; Scherenzei, J. (2006).** “Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Switzerland: first surveillance report”. Euro Surveill; 11:42-3.
3. **Arce, Z. & Asalde, R. (2012).** “*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en trabajadores del centro integral de salud de la Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo” Revista del Cuerpo Médico del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo. Chiclayo, Perú. HNAAA Vol. 5(1): Pág.33 – 35.
4. **Braun, R. (2003).** “Estudio microbiológico del tracto respiratorio superior”. Rev Chil Infec; 20 (3): 193 – 198.
5. **Broseta, A.; Chaves, F.; Rojo, P.; Otero, J. (2006).** “Emergencia de un clon de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de origen comunitario en la población pediátrica del sur de Madrid”. Enferm Infecc Microbiol Clin; 24:31-5.
6. **Cabanillas, G.; López, S.; Medina, F.; Siancas, C.; Peña, E.; Castillo, E. (2012).** “Características de la sepsis neonatal en el Hospital Almanzor Aguinaga Asenjo durante los años 2011 – 2012”. REVISTA MEDICOCIENTÍFICA DEL HOSPITAL NACIONAL ALMANZOR AGUINAGA ASENJO. Págs. 6-10.

7. **Carvalho, M. (2013).** *Schinus terebinthifolius Raddi*: chemical composition, biological properties and toxicity. Rev. Brasileira de Plantas Medicinales, vol.15.
8. **Cedamano, I. & Mejía, E. (2014).** “Efecto inhibitorio in vitro del aceite esencial de *Shinus molle* L. “molle” sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175”. Revista Pueblo Continente. Vol. 25(2) pág.39-45.
9. **Centers for Disease Control and Prevention. (1999).** “Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Minnesota and North Dakota, 1997-1999. Morb Mortl Wkly Rep. 1999; 48:707-10.
10. **Cervantes, E.; García, R.; Salazar, P. (2014).** “Características generales del *Staphylococcus aureus*” Departamento de Microbiología y Parasitología. FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM), México.
11. **Cruz, A.; Rodríguez, N.; Rodríguez, C. (2010).** Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* Y *Silybum marianum* Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 13 (2): 117-124.
12. **Dellacassa, E. (2010).** “Normalización de Productos Naturales Obtenidos de Especies de la flora Aromática Latinoamericana”. Editora Universitaria De PUCRS. Porto Alegre.
13. **Díeza, O.; Batista, N.; Bordesb, A.; Lecuonac, M.; Lara. M. (2007).** “Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio superior. Enferm Infecc Microbiol; 25 (6): 387 - 393.
14. **Durauffourd, C.; Dhervocourt, L.; Lapraz, J. (1986).** “Cuadernos de Fitoterapia Clínica”. 1ª edición. Barcelona, España: Edit. Masson S.A.

- 15. Echevarria, J. & Iglesias, D. (2003).** “*Staphylococcus* metilino - resistente, un problema actual en la emergencia de Resistencia entre los gram positivos”, Rev. Med. Hered; 14(4):195-203.
- 16. Garay, C.; Mamani, V.; Aguilar, K.; Aguilar, E. (2016).** “Efecto antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de *Schinus molle*, *Piper elongatum*, *Luma chequen* (Molina) A. Gray y *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling frente a *Streptococcus mutans* (ATCC 35668)”. UNIVERSIDAD ANDINA DEL CUSCO. INSTITUTO DE ENFERMEDADES TROPICALES Y BIOMEDICINA DE CUSCO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO. Presentado en el XV Congreso Nacional de Botánica.
- 17. García, C. (2006).** “Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple”. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Agropecuarias. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO - UNIDAD LAGUNA, México. Pág. 17.
- 18. Goode, W. J & Hatt, P. (1975).** “Métodos de Investigación Social”. 5ª ed. SP Nacional, 488p. México: Trillas.
- 19. Gonzalez, A. (2009).** “Actividad cicatrizante de una pomada con aceite esencial de *schinus molle* L. “molle” en ganado vacuno con heridas infectadas y en ratones”. Tesis de grado Farmacia y Bioquímica, Ibarra, Ecuador. Pág. 32.
- 20. Gómez, S. & Pereira, J. (2016).** “Evaluación de la actividad anti-*Staphylococcus aureus* del extracto alcohólico de hojas de *Anacardium occidentale* Linn. “Casho” mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer)”. Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico. UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA. FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA, Iquitos – Perú.

- 21. Guala, M.; Lapissonde, M.; Elder, H.; Pérez G. (2014).** “Efecto Acaricida del Aceite Esencial de Aguaribay (*Schinus molle* L.) Y sus Fracciones en Colmenares de Abejas (*Apis mellifera*) en Relación con la Composición Química”. UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL, FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA, Santiago del Estero 2654, 3000 Santa Fe-Argentina. Revista Información Tecnológica Vol. 25 Nº 2 págs.151-156.
- 22. Gualtieri, M.; Araque, M.; Carmona, J.; García, M.; Di Bernardo, M.; Ríos, N.; Villalobos, C.; Fung, Y.; Uscategui, N.; Sosa, F. (2012).** “Actividad antibacteriana del *Schinus molle* L. cultivado en Italia”. Laboratorio de Investigación de Medicamentos Orgánicos. GITAEF-Grupo de Investigaciones en Toxicología Analítica y Estudios Farmacológicos. FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS, UNIVERSIDAD DE LOS ANDES. Mérida-Venezuela.
- 23. Guerra L. (2011).** “Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de aceites esenciales de plantas usadas en medicina tradicional”. Tesis como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación terminal en Química Biomédica. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE MEDICINA. Monterrey – México.
- 24. Gutiérrez, M. (2013).** “Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero" sobre la viabilidad de *Streptococcus* β -hemolítico in vitro”. Tesis para obtener el título de Biólogo-Microbiólogo. UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO, Trujillo-Perú.
- 25. Heleno, B. (2004).** “Conferencia Magistral Investigación en Plantas Medicinales: Desafíos y Oportunidades. Segundo Simposium Internacional de Plantas Medicinales y Fitoterapia. Instituto de Fitoterapia Americano. Lima – Perú. 9 -12.

- 26. Herrera, N. (2013).** “Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Schinus molle* L. (MOLLE) sobre viabilidad de *Streptococcus* β -hemolítico in vitro”. Tesis para obtener el título de Biólogo- Microbiólogo. UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO, Trujillo-Perú.
- 27. Huaihua, P. & Tacusi, R. (2016).** “Efecto alelopático de *Schinus molle* L. (ANARCADIACEAE) sobre los bancos de semillas de malezas de Izcuchaca (Anta) y el invernadero de la UNSAAC”. UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO. Presentado en el XV Congreso Nacional de Botánica.
- 28. Huamaní, M. & Ruiz, J. (2005).** “Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida Albicans* y *Aspergillus Niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú”. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA. E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA.
- 29. Instituto Nacional de Salud. (2007).** “Manual de procedimientos para pruebas de susceptibilidad del INS.”
- 30. Instituto Nacional de Salud. (2010).** “Informe de Resistencia antimicrobiana en hospitales en Perú.”
- 31. Kaplan, S.; Hulten K.; González B. (2005).** “Three-year surveillance of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children”. Clin Infect Dis; 40:1785-1791.
- 32. Koneman, E.; Allen, S.; Dowell, V.; Janda, W.; Sommers, H., Winn, C. (2004).** “Diagnóstico Microbiológico. 3ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana.

- 33. Lannacone J. & Alvarino L. (2010).** "Toxicidad de *Schinus molle* L. (*Anacardiaceae*) a cuatro controladores biológicos de plagas agrícolas en el Perú". Acta zoológica mexicana Instituto de ecología México. 2010; 26(3): 603 – 615.
- 34. Madigan, M.; Martinko, J.; Parker, J. (2003).** "Biología de los microorganismos". 10^{ma} ed. Madrid: Prentice Hall.
- 35. Mamani, E.; Luján, Daniel.; Pajuelo, G. (2006).** "Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*". Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. An Fac Med. Lima 2006; 67(2).
- 36. Molinari, E. (2013).** "Estudio Fitoquímico y Potencial biosida de los aceites extraídos de *Shinus Molle*". Tesis de grado, Fitoquímica, UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA, Lima - Perú.
- 37. Organización Panamericana de Salud (1998).** "Situación de la Medicina Tradicional en America". Bol. Org. Panam. Salud.
- 38. Park, K. & Chess B. (2012).** "Foundations in Microbiology". 8^a Edition. Mc Graw Hill. United States.
- 39. Pauli, A. (2001).** Antimicrobial properties of essential oil. International jurnal of aromatherapy, 126-33.
- 40. Pérez, L. (2005).** "Aislamiento y caracterización de compuestos de plantas del noreste de México con actividad contra cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*" (México). Tesis como requisito parcial para obtener el Grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Química Biomédica. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN. FACULTAD DE MEDICINA.

- 41. Pignatelli, P. (2009).** L'usodelle piante medicinali in zootecnia, una realta in crescita. QuaderniZooBioDi: 2. Pág. 2-7.
- 42. Piñero, R.; Hijano, F.; Álvez, F.; Fernández, A., Silva, J. (2011).** “Documento de consenso sobre el diagnóstico y tratamiento de la faringoamigdalitis aguda”. An Pediatric; 75 (5): 342.
- 43. Prats, G. (2005).** “Microbiología clínica”. 1° ed. Madrid: Editorial Panamericana.
- 44. Purcell, K. & Fergie, J. (2005).** “Epidemic of community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections: a 14-year study at Driscoll Children's Hospital”. Arch Pediatr Adolesc Med; 159:980-985.
- 45. Ramírez, A.; Isaza, G.; Pérez, E. (2013).** “Especies vegetales investigadas por sus propiedades antimicrobianas, inmunomoduladoras e hipoglicemiantes en el departamento de caldas (Colombia, Sudamérica) Revista Biosalud, Volumen 12 No. 1. págs. 59 – 82.
- 46. Ribeiro, A.; Dias, C.; Berquó, L.; Ferreira, F. (2005).** “First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America”. J Clin Microbiol; 43:1985-8.
- 47. Rivadeneira, D. & Álvarez, P. (2015).** “Potencial biosida del aceite esencial DE *Schinus molle* L. (Molle) frente al gluconato de clorhexidina al 0.12% sobre *Streptococcus mutans*, principal agente cariogénico”. Estudio *in vitro*. Facultad de Odontología. Universidad Central del Ecuador.
- 48. Rivera, M. (1998).** “*Estreptococo* Beta Hemolítico grupo A (*Streptococcus pyogenes*)” Departamento de Pediatra. Universidad Nacional Autónoma de Honduras. Honduras.

- 49. Rodríguez, R.; Calderón, E.; Gómez, D.; Espinosa, L. (2000).** “Características de la resistencia antimicrobiana de una colección clínica de *Streptococcus pyogenes*”. Departamento de Infectología, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México, D.F., México.
- 50. Rodríguez, Y.; Espinoza, S.; Vergara, M. (2014).** “Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” sobre el crecimiento *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Salud & Vida Sipanense. Vol. 1/Nº2. ISSN 2313-0369/2014.
- 51. Romero J. & Villegas S. (2017).** “Efecto inhibitorio *in vitro* de extractos etanólicos de la cáscara *Punica granatum* “granada” y *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*”. Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología –Microbiología y Parasitología. UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUÍZ GALLO. Lambayeque – Perú.
- 52. Romero, R. (2007).** “Microbiología y Parasitología Humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias”. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana.
- 53. Salazar, R. (2001).** “Manejo de semillas de 75 especies forestales de América Latina. Centro Agronómico Tropical de enseñanza de Costa Rica. Costa Rica; 18(2):22 – 24.
- 54. Segura, S.; Rodríguez, M.; Chico, J. (2015).** “Actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en condiciones de laboratorio”. Laboratorio de Fitopatología. Facultad de Ciencias Biológicas. UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO, Trujillo - Perú. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas (**REBIOL**) Vol.35 N°2 págs. 47-52.

- 55. Steel, R. & Torrie, J. (1983).** Bioestadística: Principios y Procedimientos McGraw-Hill 2ª Ed. 622 p.
- 56. Vásquez, J. & Díaz, D. (2011).** “Efecto antimicótico *in vitro* del aceite de molle (*Schinus molle* Linneo) sobre *Trichophyton mentagrophytes*”. UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS, ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA.
- 57. Villar, M. & Villacencio, O. (1992).** “Uso de plantas medicinales en el tratamiento del asma bronquial. Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna. 5 (4).
- 58. Wimalaratne P. (1999).** “Isolation and identification of house fly, *Musca domestica* L., repellents from pepper tree, *Schinus molle* L”. Journal of Chemical Ecology. Chile; 22(1): 49 – 59.
- 59. Yáñez, X. & Cuadro, O. (2012).** “Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona” (Colombia). UNIVERSIDAD DE PAMPLONA. PAMPLONA, COLOMBIA. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, Vol.1 N°10, págs. 52-61.

IX. ANEXOS

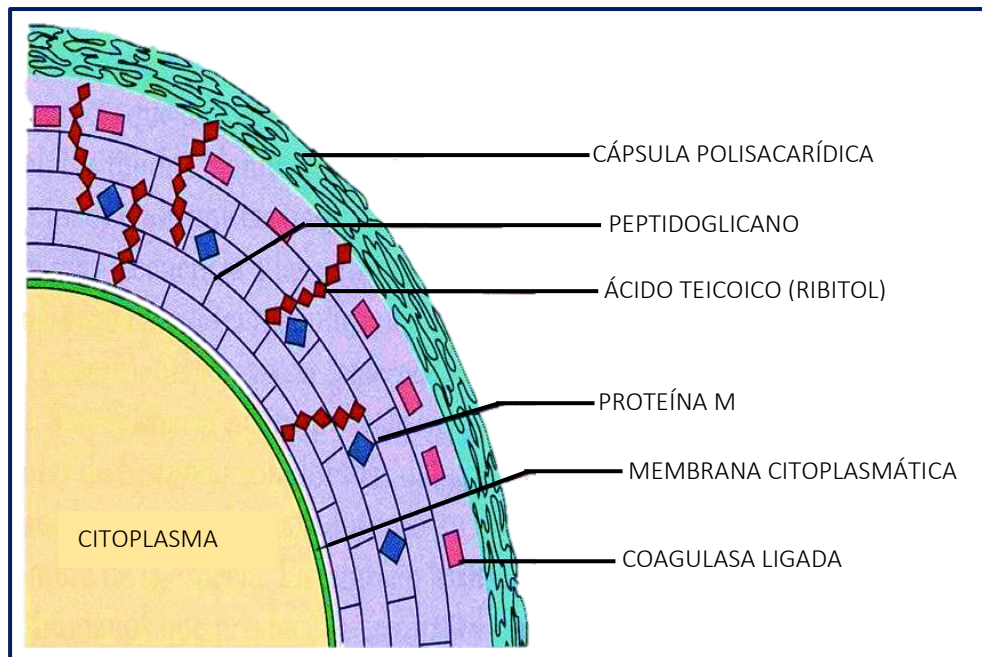
Anexo 1: Clasificación Taxonómica de *Schinus molle* L.



CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

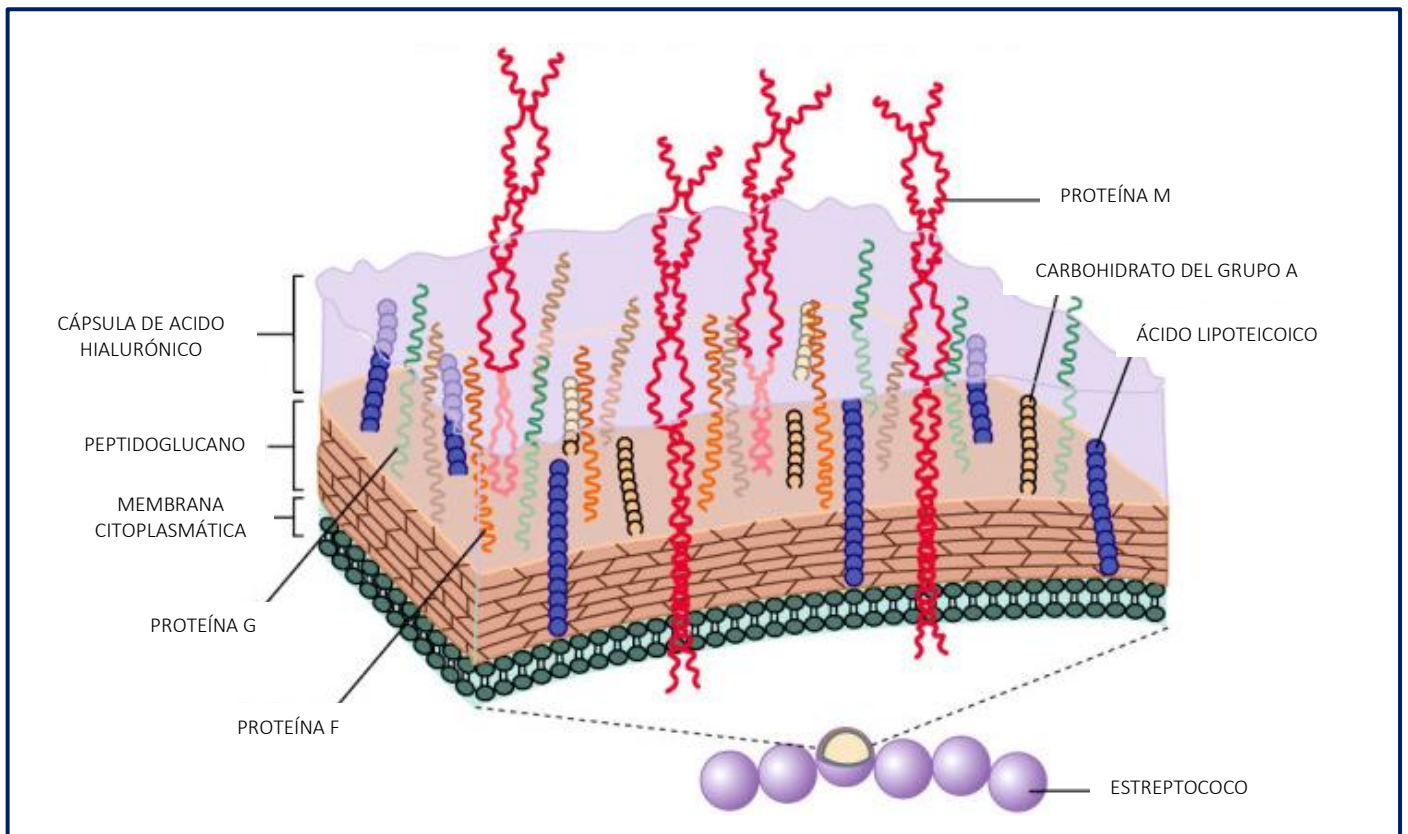
Reino	: Plantae
Phyllum	: Spermatophyta
Subphyllum	: Magnoliophytina
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Rosidas
Orden	: Sapindales
Familia	: Anacardiaceae
Género	: <i>Schinus</i>
Especie	: <i>Schinus molle</i> L.

Anexo 2: Pared celular de *Staphylococcus aureus*.



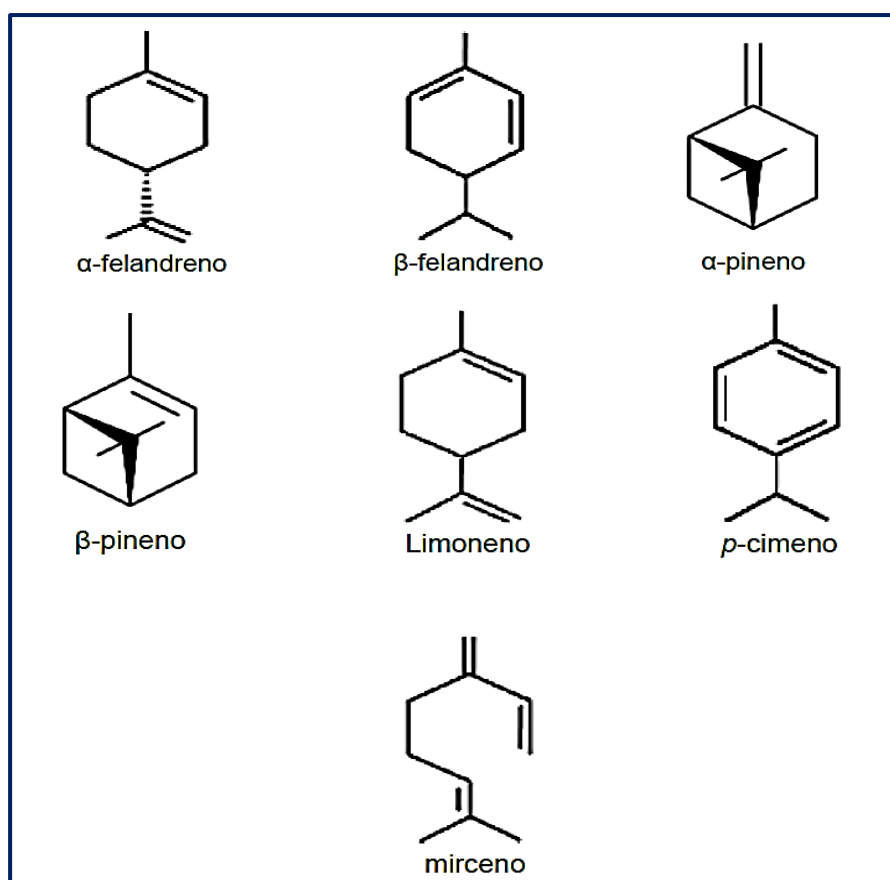
Fuente: Murray. Microbiología Médica. 5° edición.

Anexo 3: Pared celular de *Streptococcus* β -hemolítico (*S. pyogenes*).



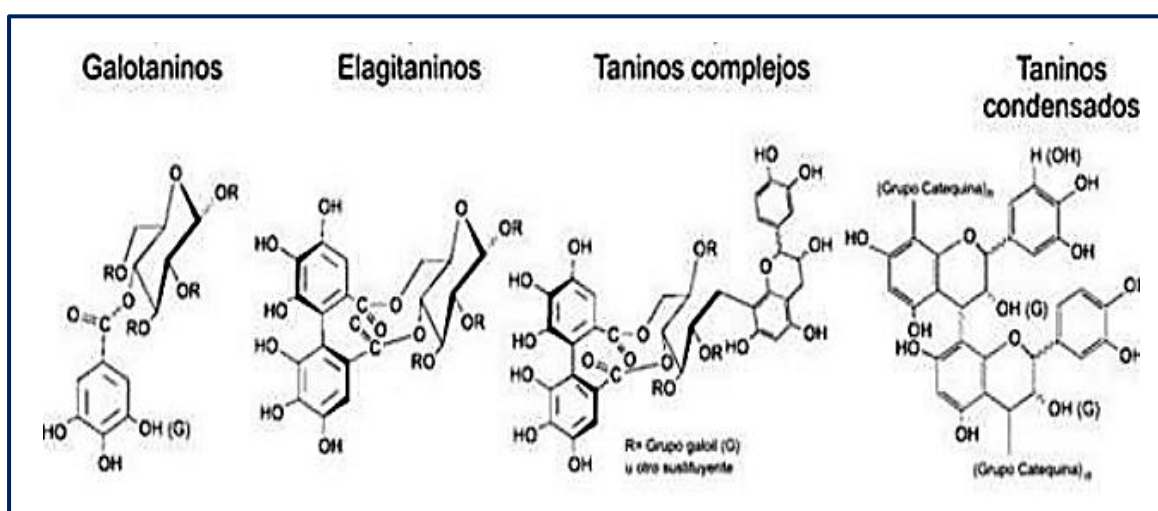
Fuente: Murray. Microbiología Médica. 6° edición.

Anexo 4: Estructura molecular de los componentes volátiles más comunes del aceite esencial de molle.

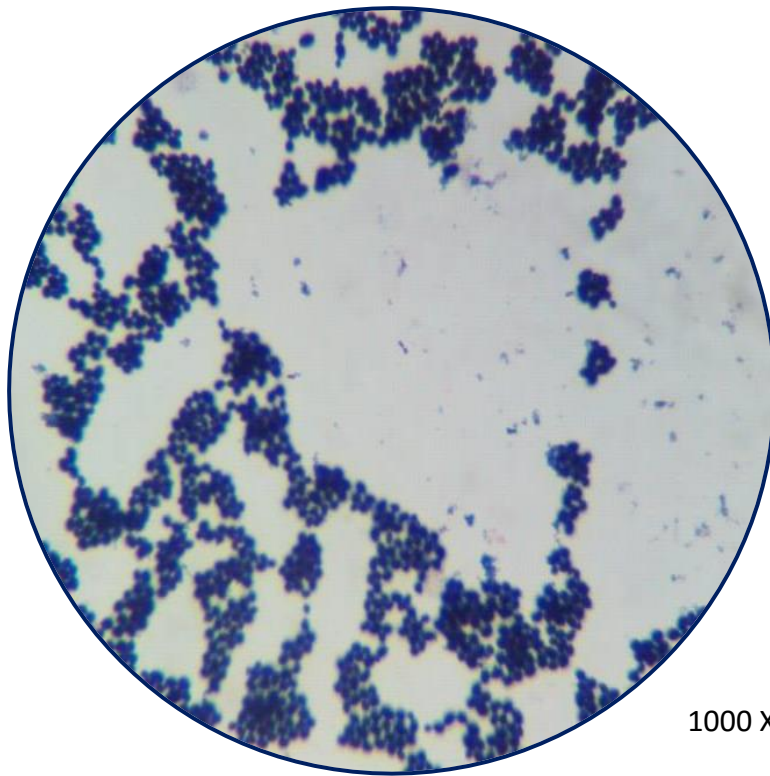


Fuente: Nobre et al. (2000), Palá (2002), Quiminet (2009).

Anexo 5: Clasificación química de los taninos.

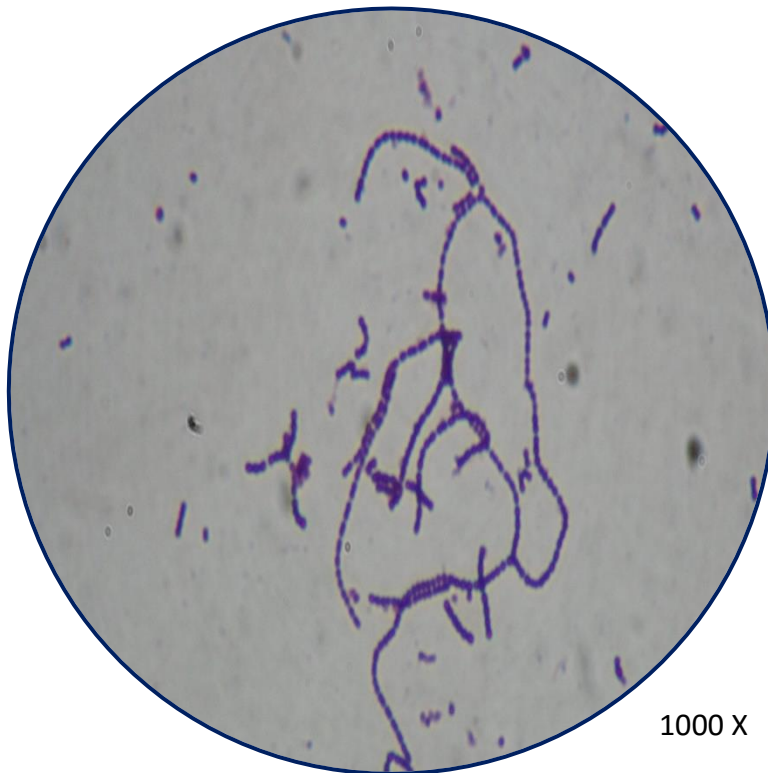


Anexo 6: Imagen microscópica de *Staphylococcus aureus*.



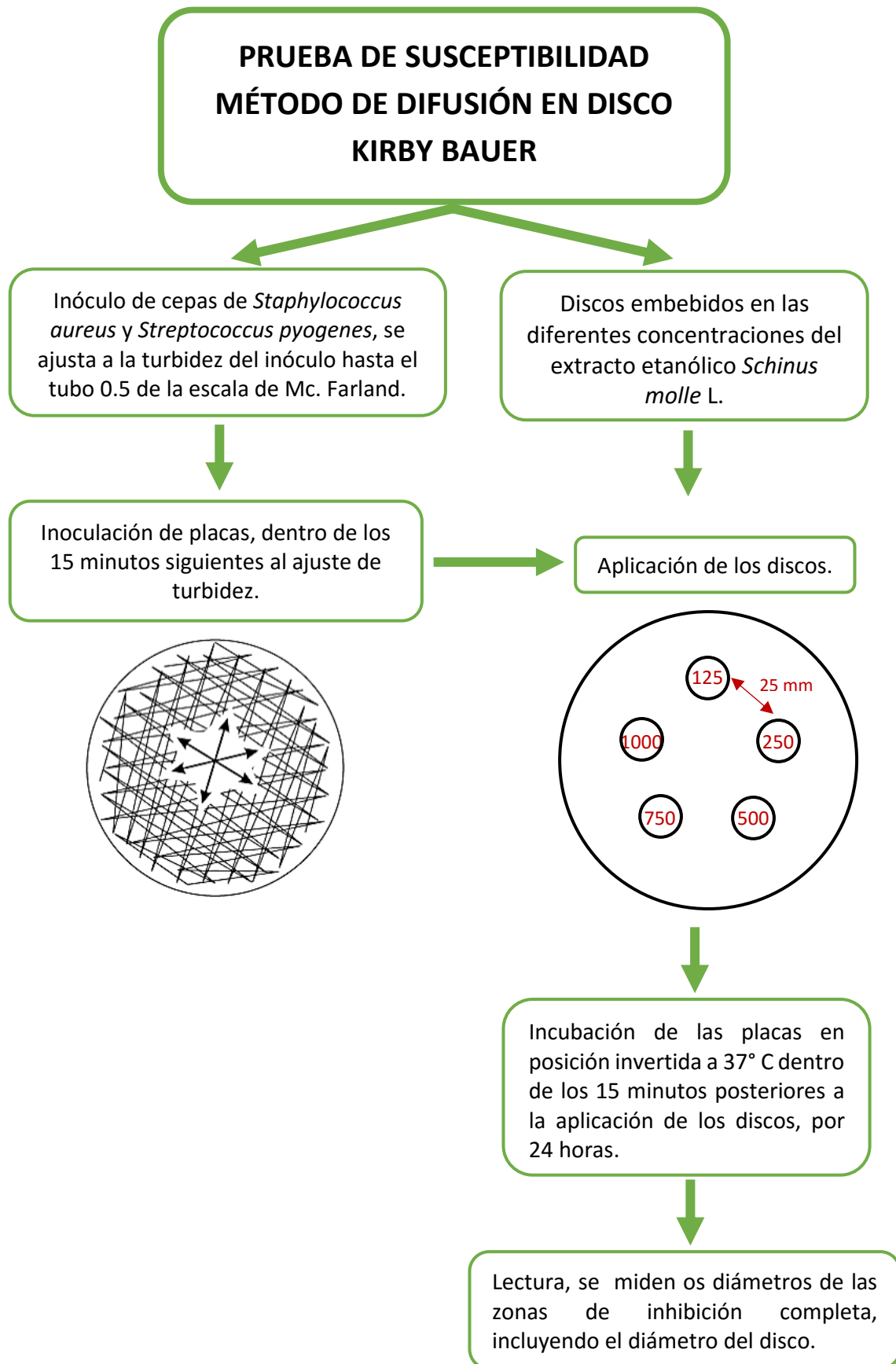
1000 X

Anexo 7: Imagen microscópica de *Streptococcus* β -hemolítico.

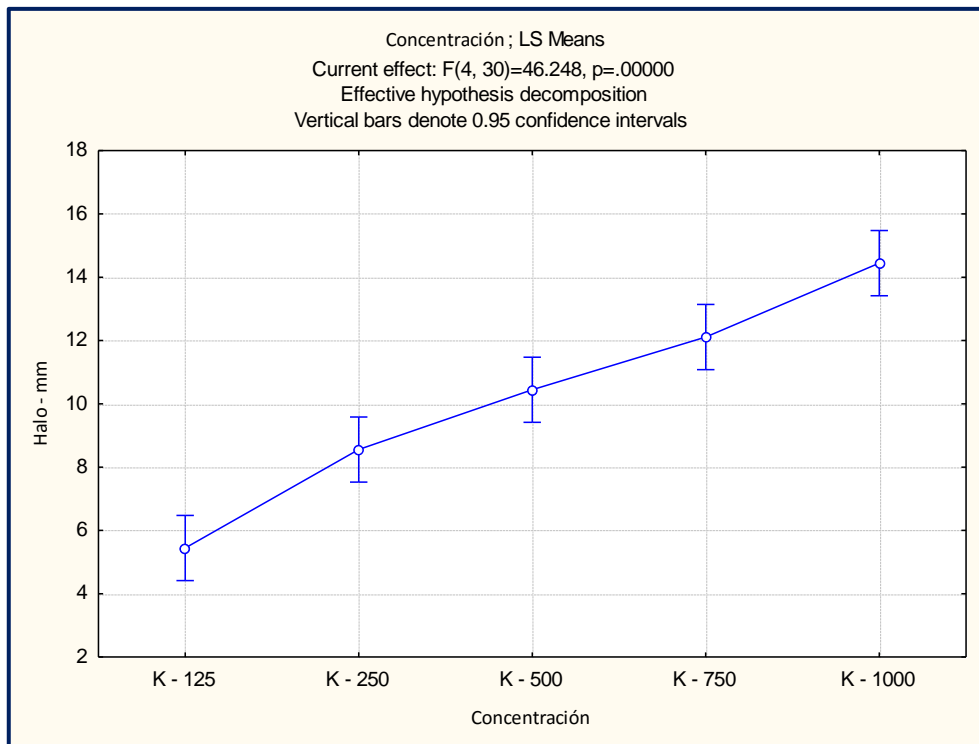


1000 X

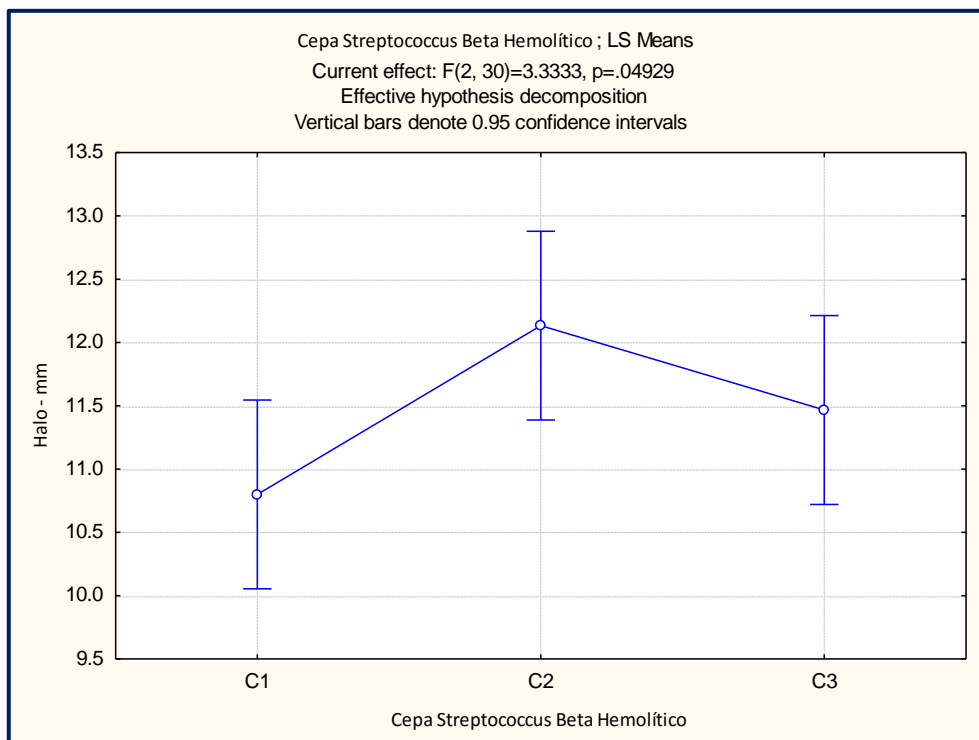
Anexo 8: Prueba de susceptibilidad método de difusión en disco KIRBY BAUER.



Anexo 9: Gráfico de la prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de *Staphylococcus aureus* en función a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Schinus molle* L.



Anexo 10: Gráfico de la prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los diámetros de inhibición de *Streptococcus* β -hemolítico frente al extracto etanólico de *Schinus molle* L.



Anexo 11: Gráfico de la prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de *Streptococcus* β -hemolítico en función a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Schinus molle* L.

